



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FÁRMACIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**JAMILA SUEIRA DE JESUS SILVA**

**MANIPULAÇÃO DO CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM  
ÁGUA RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO:  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOMOLÉCULAS**

SALVADOR

2021



**JAMILA SUEIRA DE JESUS SILVA**

**MANIPULAÇÃO DO CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM  
ÁGUA RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO:  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOMOLÉCULAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos (PGAli) da Universidade Federal da Bahia – UFBA, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências de Alimentos

Prof. Dr.<sup>a</sup>. Janice Izabel Druzian

***Orientadora***

Prof. Dr. Lucas Guimarães Cardoso

***Coorientador***

SALVADOR

2021

**JAMILA SUEIRA DE JESUS SILVA**

**MANIPULAÇÃO DO CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM  
ÁGUA RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO:  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOMOLÉCULAS**

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado da candidata  
Jamila Sueira de Jesus Silva, em sessão pública realizada em 05 de novembro de 2021

---

Prof. Dr. Lucas Guimarães Cardoso (Coorientador)  
Departamento de botânica (UFSCar)  
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – SP, Brasil

---

Prof. Dr. Icaro ThiagoAndrade Moreira  
Departamento de Engenharia ambiental - Escola Politécnica da Bahia  
Universidade Federal da Bahia (UFBA) – SSA, Brasil

---

Dr<sup>a</sup> Jéssica Hartwig Duarte  
Pond Technologies

Salvador, 05 de novembro de 2021

## **Agradecimentos,**

*À Deus que é a luz da minha vida.*

*À minha mãe pelo amor e apoio incondicional.*

*Aos meus familiares, meu pai, minha irmã, minha prima e amigos pelo apoio e compreensão.*

*Ao meu companheiro de jornada por estar sempre ao meu lado.*

*Ao meu coorientador Lucas Cardoso por toda atenção, orientação, correção, colaboração e amizade.*

*À minha orientadora Janice Druzian pela atenção, orientação e por me fazer refletir sobre o papel do educador e do pesquisador.*

*À professora Mariângela Lopes (UNEB) pelo carinho e conselhos.*

*À equipe, aos professores e aos amigos do laboratório LAPESCA- UFBA pela atenção e auxílio constante. Especialmente: Bianca Andrade; Carolina Souza; Danilo Alves; Denilson Assis; Luigi Pesssôa; Paulo Vitor Lemos; Renata Quartieri e Saulo Mata.*

*Ao professor Henrique Marcelino pelo acesso ao laboratório de análises*

*Às minhas estudantes de IC (Iniciação científica) Ana Victória Borges; Isabella dos Anjos, pelo auxílio e comprometimento.*

*À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).*

*Ao programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos (PGAli), aos coordenadores, aos professores e servidores pela dedicação e atenção.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto CHAMADA CNPQ/EQUINOR ENERGIA LTDA. 2018 – FORMAÇÃO DE MESTRES E DOUTORES EM PETRÓLEO, GÁS NATURAL E ENERGIA RENOVÁVEL (Processo 440039/2019-3, vigência 01/05/2019 a 30/06/2023).*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida. Processo 134194/2019-5. Vigência de 01/08/2019 a 30/11/2020.*

*E a todos os que contribuíram direta ou indiretamente, citados aqui ou não, para a realização deste trabalho.*

## RESUMO

A água produzida (AP) é o efluente resultante da injeção de água do mar em poços para extração de petróleo. É um efluente de significativo impacto ambiental, devido a sua alta salinidade, presença de compostos químicos e demanda crescente por combustíveis fósseis. As microalgas têm sido consideradas como promissoras para fitorremediar este efluente, reduzindo o impacto causado e produzindo biomassa de alto valor agregado. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi aumentar a produção de biomassa e biomoléculas da espécie *Chlorella vulgaris* cultivada em água produzida, como suplemento ao meio de cultivo, avaliando o efeito sinérgico de duas fontes de estresse, físico e químico. A microalga foi cultivada em diferentes concentrações de AP (não autoclavada) e BG11 (0, 30, 40 e 50%) sob fotoperíodo de 24 horas, com inóculo pré-adaptado ao mesmo fotoperíodo. Dentre os tratamentos, o cultivo contendo 70% de BG-11 e 30% de AP (AP30%), apresentou viabilidade com produção de biomassa de 1,35 g L<sup>-1</sup>. A biomassa obtida em AP30% apresentou concentração de carboidratos (37,46%) e cinzas (18,21%) superiores ao controle. Além de teores relevantes de lipídios (9,92%), proteínas (21,94%) e pigmentos como clorofila *a* (6,64 µg mL<sup>-1</sup>), clorofila *b* (10,57 µg mL<sup>-1</sup>) e carotenoides (21,38 µg mL<sup>-1</sup>). O perfil de ácidos graxos apresentou como ácidos majoritários C18:3n6 (21,50%), C20:0 (19,96%), C16:0 (17,12%) e C18:0 (12,15%), que constituíram em aproximadamente 70% do total. Quanto aos biocombustíveis a diversidade de ácidos graxos apresentou perfil ideal para a produção de biodiesel, além de bioetanol (17,02 mL 100g<sup>-1</sup>) que pode ser obtido através dos carboidratos. Portanto, o cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP apresentou alta produção de biomassa e síntese de biomoléculas.

**Palavras chave:** Microalga, *Chlorella vulgaris*, água produzida, bioprodutos, biocombustível.

## ABSTRACT

Produced water (AP) is the effluent resulting from the injection of seawater into wells for oil extraction. It is a wastewater with a significant environmental impact, due to its high salinity, presence of chemical compounds, and growing demand for fossil fuels. The microalgae have been considered promising to phyto remediation this effluent, reducing the impact caused and producing biomass with high added value. Given the above, the objective of this study was to increase the production of biomass and biomolecules of the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in produced water, through the synergistic effect of two sources physical and chemical stress. The microalgae were cultivated in different concentrations of AP (not autoclaved) and BG11 (0, 30, 40, and 50%), under a 24-hour photoperiod, with an inoculum pre-adapted to the same photoperiod. Among the treatments, the culture containing 70% of BG and 30% of AP (AP30%), showed viability with biomass production of 1.35 gL<sup>-1</sup>. The biomass obtained in AP30% showed a higher concentration of carbohydrates (37.46%) and ash (18.21%) than the control. In addition to relevant levels of lipids (9.92%), proteins (21.94%) and pigments such as chlorophyll a (6.64 µg mL<sup>-1</sup>), chlorophyll b (10.57 µg mL<sup>-1</sup>), and carotenoids (21.38 µg mL<sup>-1</sup>). The fatty acid profile presented as major acids C18:3n6 (21.50%), C20:0 (19.96%), C16:0 (17.12%), and C18:0 (12.15%), this accounted for approximately 70% of the total. As for biofuels, the diversity of fatty acids presented an ideal profile for the production of biodiesel, in addition to bioethanol (17.02 mL 100g<sup>-1</sup>) which can be obtained from carbohydrates. Therefore, the adaptation of the inoculum to the 24-hour photoperiod acted synergistically with AP, favoring the final production of biomass and the synthesis of biomolecules by the microalgae

**Keywords:** Microalgae, *Chlorella vulgaris*, produced water, bioproducts and biofuels

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>11</b>
Figura 1	Representação das organelas da <i>Chlorella vulgaris</i> e sua reprodução .....17
Figura 2	Sistema de cultivo de microalgas aberto e fechado.....19
Figura 3	Alguns fatores que interfere na composição de bioprodutos.....23
Figura 4	Estruturas de polissacarídeos de armazenamento.....26
Figura 5	Estrutura dos principais pigmentos encontrados nas microalgas.....27
Figura 6	As diferentes gerações de biocombustíveis.....30
Figura 7	Processo de separação da água produzida, do óleo e gás natural.....37
Figura 8	Produção de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com diferentes proporções de AP e pH.....48
Figura 9	Composição bioquímica da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.....51
Figura 10	Concentração de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides totais da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.....58
Figura 11	Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.....60
Figura 12	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.....61

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I</b> .....	11
Tabela 1 Composição bioquímica de algumas espécies de microalgas.....	15
Tabela 2 Comparação dos diferentes tipos de cultivo.....	18
Tabela 3 Conteúdo potencial de pigmentos em <i>Chlorella vulgaris</i> em diferentes condições de crescimento.....	27
Tabela 4 Perfil de minerais em <i>Chlorella vulgaris</i> .....	28
Tabela 5 Principais componentes e suas concentrações da água produzida.....	38
Tabela 6 Composição química da água produzida.....	46
Tabela 7 Parâmetros de crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em meio BG-11 suplementado com diferentes concentrações de AP e controle.....	49
Tabela 8 Composição de ácidos graxos da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.....	53
Tabela 9 Propriedade de biodiesel dos ácidos graxos obtidos da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.....	56



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – Manipulação do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em água residual da extração de petróleo: produção de biomassa e biomoléculas.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Microalgas.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2 Espécie - <i>Chlorella vulgaris</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3 Tipos e sistemas de cultivo.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.4 Condições de cultivo.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.5 Composição bioquímica.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Biotecnologia de biocombustíveis.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1 Biodiesel.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3 Bioetanol.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Águas residuais e Biorremediação.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Água produzida.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Considerações finais.....</b>	<b>40</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Coleta e composição química da água produzida .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Microalga e aclimação do inóculo .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Condições de cultivo e tratamentos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Crescimento e pH.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Composição Bioquímica da biomassa.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6 Composição de ácidos graxos.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 Avaliação das propriedades de biodiesel.....</b>	<b>44</b>
<b>4.8 Clorofila <i>a</i>, clorofila <i>b</i> e carotenoides totais.....</b>	<b>44</b>
<b>4.9 Conversão teórica de carboidratos da biomassa de microalgas em etanol</b>	<b>45</b>
<b>4.10 Análise termogravimétrica (TGA) .....</b>	<b>45</b>
<b>4.11 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b>	<b>45</b>
<b>4.12 Análise estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Caracterização química da água produzida.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Crescimento e pH.....</b>	<b>47</b>

<b>5.3</b>	<b>Composição bioquímica da biomassa.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4</b>	<b>Composição de ácidos graxos.....</b>	<b>52</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação das propriedades de biodiesel.....</b>	<b>54</b>
<b>5.6</b>	<b>Clorofila <i>a</i>, clorofila <i>b</i> e carotenoides totais.....</b>	<b>57</b>
<b>5.7</b>	<b>Conversão teórica de carboidratos da biomassa de microalgas em etanol</b>	<b>59</b>
<b>5.8</b>	<b>Análise termogravimétrica (TGA) .....</b>	<b>59</b>
<b>5.9</b>	<b>Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## **Capítulo I**

# **MANIPULAÇÃO DO CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM ÁGUA RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO: PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOMOLÉCULAS**

## 1 INTRODUÇÃO

O efluente resultante da produção de petróleo, também conhecida por água produzida (AP), é uma água residual normalmente composta por hidrocarbonetos, metais pesados e sais inorgânicos (MOTTA *et al.*, 2013). A composição e o volume da AP dependem da localização do poço, da frequência da injeção de água e dos constituintes extraídos do petróleo (AMMAR *et al.*, 2018). No ano de 1990 a produção mundial de AP foi 190 milhões de barris /dia, 30 anos depois a produção aumentou para aproximadamente 320 milhões de barris /dia (DUDEK *et al.* 2020). No Brasil, segundo a Agência Nacional de Petróleo e Gás (ANP) o volume de AP em 2016 foi de aproximadamente 110,12 milhões m<sup>3</sup>.

O grande volume de AP, a escassez de água pura e a necessidade de maior demanda energética, tem aumentado o interesse no uso de microalgas como fontes de energia, para o tratamento e reuso de águas residuais (OTONDO *et al.*, 2018; ANTO *et al.*, 2019; MOTTA *et al.*, 2013). Além disso, as microalgas apresentam composição rica em ácidos graxos, proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e pigmentos tornando-se fonte de bioprodutos utilizados na aquicultura, indústria farmacêutica, alimentícia e de biocombustíveis (SATYANARAYANA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2017; SATHASIVAM *et al.*, 2017).

Apesar da AP conter muitos componentes tóxicos que podem inibir o crescimento da microalga, também possui nutrientes necessários para o cultivo, como ferro, potássio e manganês (HOPKINS *et al.*, 2019; GRAHAM *et al.*, 2017). Pesquisas têm sido desenvolvidas para tornar viável a produção de microalgas em AP. Ammar *et al.* (2018) cultivaram *Nannochloropsis oculata* e *Isocrysis galbana* em água produzida, durante 15 dias, em três percentuais de AP (10, 25 e 50%). Arriada e Abreu (2014) cultivaram *Nannochloropsis oculata* em água produzida em diferentes percentuais (0, 50 e 100%). Rakhmadumila e Muntalif (2020) cultivaram *Chlorella* sp. em água produzida artificial em diferentes concentrações e obtiveram produção de 2,51 g L<sup>-1</sup> com 25% de AP artificial.

A utilização do gênero *Chlorella* apresenta-se como potencial para cultivo em AP. A espécie se destaca por ser uma das microalgas mais produzidas e conhecidas no mundo, sendo também tolerantes a águas residuais de ambientes industriais, agrícolas e municipais, tornando-se úteis no tratamento de efluentes e ideais para produção de biomassa (KUMAR *et al.*, 2017).

A potencialidade da espécie *Chlorella*, está baseada na característica que as microalgas possuem de alterar as condições fisiológicas de acordo com meio ambiente que estão inseridos. Este comportamento possibilita a manipulação do crescimento e composição bioquímica da microalga (CHIA *et al.*, 2013). Algumas estratégias são utilizadas para aumentar produção de biomassa e os rendimentos de alguns compostos, como manipulação de agentes estressores químicos ou físicos. Sendo o estresse químico realizado através da manipulação da composição do meio de cultivo e físico pela manipulação das condições como luminosidade, temperatura, salinidade e pH (BENAVENTE-VALDÉS *et al.*, 2016).

Portanto, maximizar o crescimento de microalgas cultivadas em águas residuais, depende da manipulação de fontes estressoras nos cultivos (ANSILAGO *et al.*, 2016). Além, do conhecimento da fisiologia microalgal para otimizar sua produção (CHIA *et al.*, 2013). Logo, a manipulação de fatores físicos e químicos pode ser utilizada para influenciar o metabolismo celular das microalgas, aumentando o crescimento e estimulando a síntese de biomoléculas de interesse a partir da sua composição (BRINDHADEVI *et al.*, 2021). Diante disto, o objetivo deste estudo foi estimular a produção de biomassa e síntese de biomoléculas da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em água produzida, através do efeito sinérgico de duas fontes de estresse, físico e químico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Estimular a produção de biomassa e síntese de biomoléculas da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em água produzida, através do efeito sinérgico de duas fontes de estresse, físico e químico.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição físico-química da água produzida;
- Determinar os parâmetros de crescimento da *Chlorella vulgaris* em água produzida;
- Caracterizar a composição bioquímica de biomassa produzida (proteínas, lipídios, umidade, cinzas, carboidratos, clorofila *a* e *b* e carotenoides totais);
- Determinar o perfil e a composição de ácidos graxos;
- Avaliar as propriedades e a qualidade de biodiesel teórico;
- Estimar o valor teórico de bioetanol através da concentração de carboidratos fermentativos.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Microalgas

As microalgas são organismos procariontes e eucariontes que utilizam luz solar e outros nutrientes para fotossíntese e produção de biomassa de alto valor agregado (VENDRUSCOLO *et al.*, 2019; ENAMALA *et al.*, 2018). Elas existem a aproximadamente 3,4 bilhões de anos e apresentam mais de 40.000 espécies conhecidas, em diferentes meios de cultura (SAFI *et al.*, 2014). Apesar da larga quantidade de espécies existentes, poucas cepas de microalgas têm sido amplamente estudadas ao longo dos anos (CARDENAS, 2018). A cultura de microalgas pode ser identificada de acordo com a forma, a cor, o tamanho da célula e a textura (NIE, 2020).

O primeiro estudo sobre produção de microalgas foi na década de 1950, com as espécies *Spirulina* e *Chlorella*, consideradas as mais cultivadas no mundo (CARDENAS, 2018). O uso de microalgas para alimentação foi registrado pelos Astecas e outros mexicanos, que consideravam como fonte de nutrientes (SAFI *et al.*, 2014). Atualmente, as microalgas são utilizadas para a produção de diversos compostos através da sua biomassa, como carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos insaturados, pigmentos, enzimas, vitaminas, extratos para produção de fertilizantes, biocombustível, ou como biorremediador em águas residuais, solos e fluxos de gases (CARDENAS, 2018; ARRIADA; ABREU, 2014).

A composição da biomassa muda para cada espécie e do meio de cultivo que elas estão inseridas. No entanto, normalmente a maior composição é de proteína, lipídios e carboidratos (Tabela 1). A escolha da espécie de microalga está relacionada à taxa de crescimento rápido, a alta produtividade, a adaptação de diferentes águas residuais e a capacidade de remoção de nutrientes. Algumas microalgas não apresentam todas as condições abordadas, mas é escolhida primeiramente em relação à alta taxa de crescimento (LI *et al.*, 2019).

**Tabela 1** – Composição bioquímica de algumas espécies de microalgas

Espécie de microalgas	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 – 56	25 – 30	4 – 7
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	31,1	10,8	24 – 31
<i>Aphanizomenon flasaquae</i>	62	23	3
<i>Batryococcus braunii</i>	22	14,1	14,5 - 25
<i>Chlorella</i> sp.	51 – 58	12 – 17	10 – 48
<i>Chlorella pyrenoidas</i>	57 – 60,4	26	2 – 37
<i>Chlorella vulgaris</i>	38 – 53	8 – 27	5 – 28
<i>Chlorogoeopsis fritschii</i>	50	44	7
<i>Diacronema vikianum</i>	24 – 39	15 – 31	18 – 39
<i>Dunaliella</i> sp.	27 – 57	14 – 41	6 – 22
<i>Euglena gracilis</i>	39 – 61	14 – 18	14 – 38
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10 – 52	34	15 – 40
<i>Isochrysis galbana</i>	12 – 40	13 – 48	17 – 36
<i>Nannochloropsis</i> sp.	18 – 47	7 – 40	7 – 48
<i>Nitzschia</i> sp.	16,8	9,2	12,1 – 16
<i>Odontella aurita</i>	9 – 28	30 – 54	13 – 20
<i>Pavlova lutheri</i>	16 – 43	15 – 53	6 – 36
<i>Porphyridium cruentum</i>	27 – 57	12 – 39	5 – 13
<i>Scenedesmus</i> sp.	31 – 56	6 – 28	8 – 21
<i>Spirulina platensis</i>	43 – 77	8 – 22	4 – 14
<i>Tetraselmis</i> sp.	14 – 58	12 – 43	8 – 33

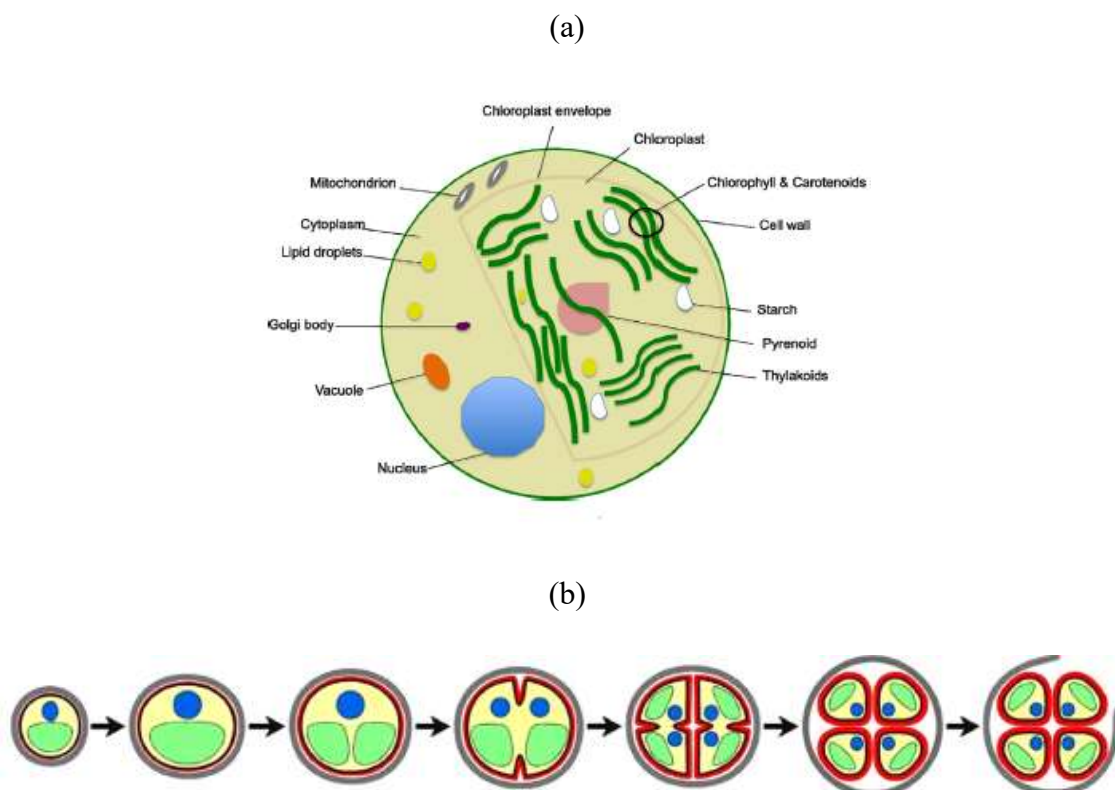
**Fonte:** Adaptado de Bernaerts *et al.*, 2019 e Li *et al.*, 2019

### 3.1.2 Espécie - *Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* são microalgas unicelulares, verdes, esférica, pertencente ao phytum: Chlorophyta, domínio: Eukaryota, classe: Ter-bouxiophyceae, ordem: Chlorellales e família: Chlorellaceae. O nome *Chlorella* vem da palavra grega chloros, que significa verde e o sufixo ella do latim, que se refere ao tamanho microscópico (SAFI *et al.*, 2014). A *Chlorella vulgaris* apresenta tamanho celular de 2-10 µm, quando jovens, mas podem atingir 17-21 nm ao ficarem adultas, com parede celular rígida, composta de glucosamina, celulose, hemicelulose e glicanos do tipo quitina. Possui citoplasma composto por várias organelas, enriquecido em água, proteínas solúveis e minerais (Figura 1a). O cloroplasto apresenta membranas internas com função de transporte de proteínas e formação de amilose e amilopectina, além de elevados níveis de fibrulose-1,5-bisfosfatocarboxilaseoxigenase, que participa da fixação do CO<sub>2</sub>, e tilacóides, onde a clorofila é sintetizada (SAFI *et al.*, 2014; BHUVANA *et al.*, 2019;



VENDRUSCOLO *et al.*, 2019). Já as mitocôndrias são constituídas de membranas duplas, fosfolipídios e proteínas, que realizam processos metabólicos para obtenção de energia necessária ao crescimento e manutenção celular (CORONADO-REYES *et al.*, 2020). A *Chlorella* apresenta ciclo de vida relativamente simples e se reproduzem assexuadamente (Figura 1b), por esporulação, onde cada célula madura se divide em quatro ou oito autósporos, liberado após a ruptura da parede celular (RICHMOND, 2004).



**Figura 1** – Representação das organelas da *Chlorella vulgaris* (a) e sua reprodução (b).

*Fonte: Safi et al., 2014.*

O primeiro cultivo de *Chlorella* para produção em larga escala ocorreu em Boston (1953), depois em Israel, Alemanha e Tchecoslováquia. A utilização dessa microalga para produção comercial aconteceu em 1961, no Japão (RICHMOND, 2004). O interesse pelo consumo humano ocorreu pela descoberta das propriedades antitumorais, antibacteriana e antioxidante, como  $\alpha$ - $\beta$  caroteno, ácido ascórbico, luteína e  $\alpha$ -tocoferol. A *Chlorella vulgaris* apresenta composição rica em vitamina do complexo B, principalmente B12 (BHUVANA *et al.*, 2019). Além de 42 a 58% de

proteínas em biomassa seca. Essa microalga apresenta também 5 a 40% de lipídios em base seca, constituído principalmente de fosfolipídios, glicolipídios, hidrocarbonetos, ceras e ácidos graxos, que são sintetizados pelo cloroplasto (CORONADO-REYES *et al.*, 2020).

### 3.1.3 Tipos e sistemas de cultivo

As microalgas podem ser cultivadas de modo autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico – Tabela 2 (VENDRUSCOLO *et al.*, 2019; ENAMALA *et al.*, 2018). No cultivo autotrófico as microalgas utilizam apenas a luz solar ou artificial e o carbono inorgânico para produzir energia. É o cultivo de menor investimento e custo operacional. A desvantagem é a dependência do clima e os cuidados com contaminação de outros microrganismos (VENDRUSCOLO *et al.*, 2019; SILVA; SIQUEIRA, 2017).

O cultivo heterotrófico não precisa de luz, utilizam fontes de carbono orgânico (glicose, glicerol, glutamato, acetato) como fonte de energia, normalmente tem maior produtividade de biomassa e acúmulo de bioprodutos. No entanto, utiliza açúcares que poderiam ser utilizados para outro objetivo. No cultivo mixotrófico ocorre à junção do cultivo autotrófico e heterotrófico, onde se utiliza carbono inorgânico para a fotossíntese e carbono orgânico como suplementação (VENDRUSCOLO *et al.*, 2019; SAFI *et al.*, 2014). Essa condição de cultivo apresenta grande rendimento de biomassa (CORONADO-REYES *et al.*, 2020).

**Tabela 2** – Comparação dos diferentes tipos de cultivo

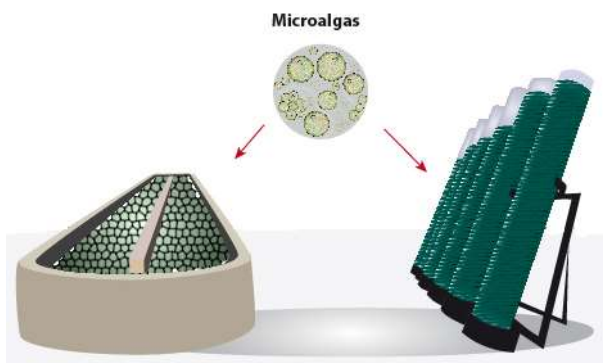
Condição de cultivo	Fonte de carbono	Fonte de energia	Densidade celular	Custo	Reator
Autotrófico	Inorgânico	Luz	Baixa	Baixo	Aberto ou fechado
Heterotrófico	Orgânico	Orgânico	Alta	Médio	Fermentador convencional
Mixotrófico	Inorgânico e orgânico	Luz e orgânico	Médio	Alto	Fechado

**Fonte:** Kadir *et al.*, 2018

O cultivo de microalgas pode ser realizado em dois tipos de sistemas, em geral, sistemas abertos e sistemas fechados. A escolha que determina o tipo de sistema depende da fonte de luz, do volume de cultura, da forma de cultivo, dos nutrientes empregados e do fornecimento de gases para garantir crescimento das microalgas e o melhor rendimento de biomassa (CORONADO-REYES *et al.*, 2020).

O sistema aberto é muito utilizado em escala comercial, devido à estrutura simples, baixo custo e fácil operação (Figura 2). As microalgas se desenvolvem de acordo com as condições ambientais. As desvantagens desse tipo de cultivo é o sombreamento das células da superfície em relação às células no fundo da lagoa, que pode ser minimizado pela movimentação das culturas e pela redução da profundidade das lagoas; a evaporação do meio de cultura; a necessidade de grandes dimensões de construção e maior risco de contaminação por outros microrganismos, como bactérias e fungos (SUN *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016; BOROWITZKA, 1999).

O sistema fechado (Figura 2) apresenta maior controle de cultivo do que os sistemas abertos, como o uso de luz artificial por fotoperíodo, simples aclimação, facilidade de esterilização e redução da foto-oxidação. Além de menor probabilidade de contaminação nas culturas. Nesses sistemas, os fotobiorreatores podem ser: tubo vertical, colunas de bolhas, colunas airlift, sacos plásticos, tanques agitados, tanques cônicos e tubulares helicoidais. A desvantagem desse sistema é o alto custo, mas uma alternativa viável é a união de ambos os sistemas, pois alia a resistência do inóculo nos biorreatores e o cultivo em larga escala do sistema aberto (FERREIRA *et al.*, 2019; CORONADO-REYES *et al.*, 2020).



**Figura 2** – Sistema de cultivo de microalgas aberto e fechado. **Fonte:** <https://www.embrapa.br>

O suprimento de nutrientes no cultivo de microalgas pode ser: contínuo, em batelada e semi-contínuo. No cultivo contínuo, os nutrientes são fornecidos a todo o momento, por isso o metabolismo é mantido quase estável. No cultivo em batelada, os nutrientes são fornecidos no início do cultivo, assim o nitrogênio celular vai diminuindo e há o aumento da composição das frações de ácido graxo. E no cultivo semi-contínuo os nutrientes são adicionados ao longo do cultivo, é empregado com objetivo de reduzir o uso de água e nutrientes, logo, do custo. Este modo de cultivo pode diminuir a limitação de nutrientes para o cultivo e a penetração de luz durante os estágios de cultivo. Porém pode ser mais suscetível à contaminação, principalmente com zooplâncton. No entanto, cepas diferentes têm respostas distintas para cada modo de cultivo, dependendo das características fisiológicas e da finalidade requerida (CHEN *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2019).

Após o cultivo, a biomassa é colhida de 1 a 10 dias, através de métodos físicos, químicos, biológicos, ou combinação entre eles. A escolha do método deve levar em consideração o tamanho celular, a gravidade da célula, a eficiência do método, além de não provocar ruptura e perda de conteúdo, interferindo na composição da biomassa (SHIN *et al.*, 2018; ENAMALA *et al.*, 2018).

### **3.1.4 Condições de cultivo**

No cultivo das microalgas é importante manter as condições adequadas de temperatura, luminosidade, pH, aeração, CO<sub>2</sub>, nitrogênio e fósforo para as devidas funções celulares (OTONDO *et al.*, 2018; VENDRUSCOLO *et al.*, 2019). Além de meios de cultivo ricos em minerais e vitaminas (REYIMU; OZÇIMEN, 2017).

A produção de microalgas pode ser melhorada com alterações de fatores físicos e químicos que influenciam na composição da biomassa e no metabolismo das microalgas (BRINDHADEVI *et al.*, 2021). A escolha da cepa também é importante, pois considera a taxa de crescimento, a produção, o perfil de ácidos graxos e facilidade de colheita. Normalmente a microalga apresenta alta capacidade de reprodução, podendo dobrar a produção de biomassa há 3,5 horas, a depender da espécie. Então, alta taxa de crescimento favorece a redução de custo, menor tempo de colheita e menor risco

de contaminação (SHIN *et al.*, 2018). As condições de cultivo, como temperatura, luz, pH, teor de N e P tem associação direta com a taxa de crescimento e o conteúdo lipídico das microalgas (ENAMALA *et al.*, 2018).

A luz é a principal forma de obtenção de energia, juntamente com o fotoperíodo influenciam no cultivo e rendimento de biomassa (Figura 3), além do conteúdo de lipídios e clorofila (FERREIRA *et al.*, 2019). Aumentam os teores de ácidos graxos saturados e reduzem os valores de polinsaturados e monoinsaturados (BRINDHADEVI *et al.*, 2021). A luz modifica a produtividade de microalgas, pois elas não crescem bem em pouca luminosidade, e em luz intensa já observam produtividade de pigmentos e acúmulo de lipídios (LU *et al.*, 2019). A luminosidade também é essencial para assimilação de CO<sub>2</sub>, porém a intensidade depende de cada espécie, pois alta intensidade pode dificultar a fotossíntese (MATHIMANI *et al.*, 2018).

A intensidade de luz e fotoperíodo são proporcionais à produção de biomassa até o limite da fotoinibição, indicando que o microrganismo está sob estresse (CORONADO-REYES *et al.*, 2020). Segundo Brindhadevi *et al.* (2021) sob iluminação contínua (24h) a *Chlorella* sp apresentou considerável produção de biomassa (0,54 g L<sup>-1</sup>) e bom rendimento de lipídios (0,079 g L<sup>-1</sup>). Jacob-Lopes *et al.* (2009) em experimento com diferentes fotoperíodos (0:24; 2:22; 4:20; 6:18; 8:16; 10:14; 12:12; 14:10; 16:8; 18:6; 20:4; 22:2 e 24:0 - noite:dia) observaram redução na produção de biomassa e da fixação de CO<sub>2</sub> em *Aphanothece micorscopica* com a redução do período de luz.

Outro fator que altera a composição de biomassa na microalga é a temperatura (Figura 3). Os valores ótimos para o cultivo de microalgas estão entre 20 a 30 °C, mas algumas microalgas toleram maiores variações que outras. A *Chlorella* apresenta faixa ideal de temperatura entre 25 a 30 °C, mas pode se adaptar a temperaturas na faixa de 5-35 °C, com alteração bioquímica. Outras espécies de microalgas suportam temperaturas até 15 °C menor que o valor ideal, mas tem o crescimento reduzido, pois limita o sistema metabólico da microalga, com a inibição da atividade carboxilase e da assimilação de CO<sub>2</sub> fotossintético. Em temperaturas maiores que o valor ideal ocorre a respiração, onde não há fixação de CO<sub>2</sub> e sim de O<sub>2</sub>, apresentando produção de metabólitos primários e secundários reduzida. No entanto, cada espécie tem uma

temperatura de crescimento ideal (ENAMALA *et al.*, 2018; CORONADO-REYES *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2019).

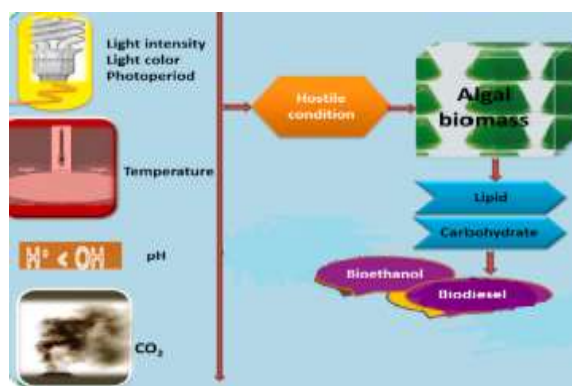
O pH é uma condição de cultivo responsável pelo crescimento de biomassa das microalgas, pela disponibilidade de CO<sub>2</sub> e de outros nutrientes, que interfere nas atividades enzimáticas (Figura 3). O valor ideal de pH depende da espécie de microalga, mas normalmente o cultivo fica em torno de 7 a 9,0. O pH também influencia na solubilidade dos pequenos poluentes, interferindo na eficiência do tratamento de remoção de compostos pelas microalgas (SHAHID *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2019). O pH alcalino facilita a captura de CO<sub>2</sub> pelas microalgas, e vai aumentando seu valor com o crescimento das microalgas e aumento da fotossíntese (ENAMALA *et al.*, 2018).

As microalgas são eficientes para fixação de dióxido de carbono, principalmente, a *Chlorella*, pois, contém clorofila *a* e *b*, que promovem alta eficiência fotossintética para converter CO<sub>2</sub> para O<sub>2</sub>. Os fatores que influenciam a absorção de CO<sub>2</sub> pelas microalgas são intensidade de luz, concentração de sal e temperatura. O fornecimento de CO<sub>2</sub> deve ser feito em temperaturas ótimas de crescimento, pois facilita a sua dissociação no meio e a absorção pelas microalgas para a fotossíntese (FERREIRA *et al.*, 2019; CORONADO-REYES *et al.*, 2020).

O nitrogênio é outro fator importante durante o cultivo. É um dos elementos mais abundantes encontrados na natureza e um dos mais importantes para o crescimento das microalgas. São responsáveis pela síntese protéica, de ácidos nucleicos e enzimas. Esse nutriente está disponível como nitrato, amônia, uréia e peptonas (SHAHID *et al.*, 2019; CORONADO-REYES *et al.*, 2020). A limitação de nitrogênio aumenta a produção de acetil CoA e acetil CoA carboxilase, que proporciona aumento do conteúdo de lipídios, com formação de ácidos graxos adequados na produção de biodiesel, além do aumento de carboidratos (SUASTES-RIVAS *et al.*, 2020; SHAHID *et al.*, 2019; SAFI *et al.*, 2014).

O fósforo (P) é outro nutriente importante para o organismo vivo, pois participa da síntese de proteínas, lipídios e compostos de carboidratos. Em meio rico de fósforo ocorre à síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), adenosina trifosfato (ATP) e hidrogênio fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH). As fontes de fósforo estão na forma de fosfato, tanto em compostos orgânicos, quanto em compostos inorgânicos. Em meios de cultivo com condições

limitadas de fosfato leva ao acúmulo de carbono orgânico e redução da divisão celular. A deficiência de fósforo afeta os processos de síntese, transcrição e ciclo do carbono (SHAHID *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2019; CORONADO-REYES *et al.*, 2020).



**Figura 3** – Alguns fatores que interfere na composição de bioprodutos. *Fonte:* Adaptado Brindhadevi *et al.*, 2021.

### 3.1.5 Composição bioquímica

As microalgas são capazes de sintetizar muitos compostos, como: proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos, alcaloides, flavonoides e terpenoides, que podem ser usados na indústria de cosméticos, de alimentos para animais, suplementos, combustíveis entre outros (CHUA; SCHENK, 2017; BAUMGARDT *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2018).

#### Lipídios

Os lipídios são compostos solúveis em solventes polares e insolúveis em água. São compostos de glicolipídios, fosfolipídios, hidrocarbonetos, ceras e pequenas quantidades de ácidos graxos livres. Estão presentes nas membranas, cloroplastos e membranas das mitocôndrias (SAFI *et al.*, 2014). As microalgas podem alterar seu metabolismo lipídico a depender de fatores como temperatura, pH, salinidade, luminosidade, estresse e da privação de alguns nutrientes como nitrogênio e fosforo, dependendo da espécie (BYRD; BURKHOLDER, 2017). Os óleos obtidos das biomassas de microalgas podem ser utilizados como biodiesel ou combustível de aviação, além do uso na indústria farmacêutica e alimentícia devido ao alto valor de ácidos graxos polinsaturados ômega 3, 6 e 9 (ALÉMAN-NAVA *et al.*, 2017).

A grande intensidade de luz aumenta a produção de lipídios, pois o excesso de luz causa armazenamento de lipídios, como resposta a evitar danos oxidativos, convertendo luz em energia química (SHIN *et al.*, 2018). Shekh *et al.* (2016) encontraram conteúdo de lipídios variando de 7,61 – 39,21% em *Chlorella* sp, em diferentes condições, sendo o maior teor (39,21%) encontrado com o aumento da intensidade de luz (25 para 100  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). A temperatura é outro fator que muda a quantidade de lipídios produzida pela microalga, pode aumentar ou diminuir conforme a espécie. Em temperaturas altas é mais evidente a formação de ácidos graxos saturados em muitas espécies. A aeração também modifica a produção de lipídios pelas microalgas, menor quantidade de CO<sub>2</sub>, limita a fotossíntese e a produção de lipídios. pH mais ácidos reduzem o crescimento de microalgas e a absorção de carbono na síntese de lipídios (SHIN *et al.*, 2018).

O aumento de salinidade do meio provoca aumento do conteúdo lipídico em algumas microalgas. No entanto, à medida que a quantidade de lipídios aumenta ocorre biodegradação de proteínas, que interfere na taxa de crescimento e produtividade de biomassa (YUN *et al.*, 2019; SHIN *et al.*, 2018). Church *et al.* (2017) observaram que o aumento do teor de salinidade no meio de cultivo da *Chlorella vulgaris*, aumentou os teores de lipídios (12 para 16%).

O perfil de ácidos graxos também depende das condições do meio de cultivo, podendo acumular 60-68% de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (ácido palmítico C16:0; ácido esteárico C18:0, ácido palmitoleico C16:1 e ácido oleico C18:1) indicados para a produção de biodiesel. Além de ácidos graxos polinsaturados, de alto valor agregado, como ácido linoleico C18:2, ácido linolênico C18:3, ácido eicosapentaenoico C20:5, ácido docosaexaenoico (C22:6) que são utilizadas pela indústria de alimentos, rações e produtos farmacêuticos (SAFI *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Gao *et al.* (2018) em cultivo de *Chlorella* sp. em águas residuais da indústria de frutos do mar encontraram como ácidos graxos majoritários C16:0 (16,4 – 31,5%); C18:0 (18,2 – 27,2%) e C18:1 (19,1 – 25,4%).

Proteínas

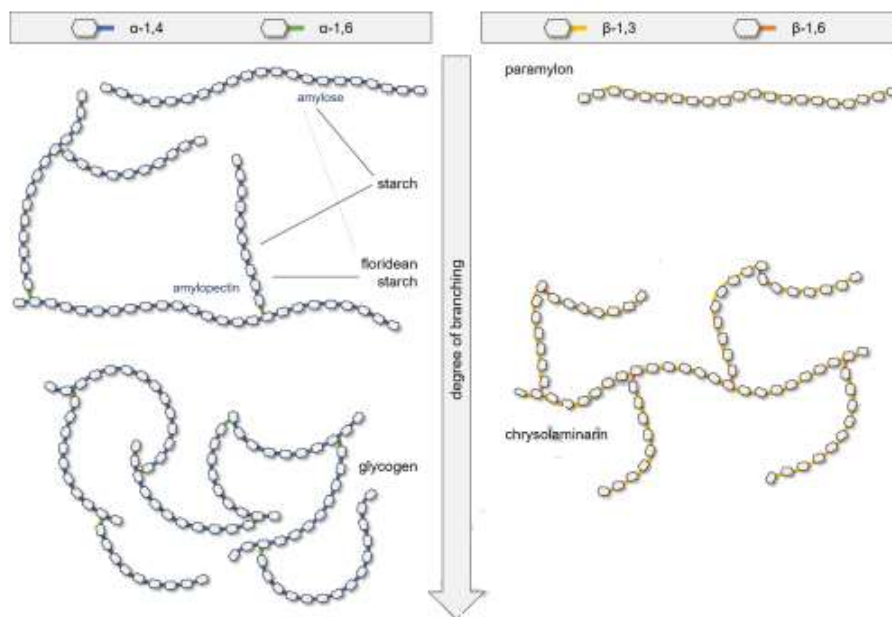


As proteínas são importantes para o crescimento e divisão celular. A maior concentração de proteínas (50%) é encontrada no interior da célula, 20% na parede celular e 30% migram entre a parte interna e externa (SAFI *et al.*, 2014). As proteínas são principalmente associadas ao cloroplasto. Seu valor nutricional é amplamente estudado, com perfil favorável de aminoácidos e boa digestibilidade (BERNAERTS *et al.*, 2019). O perfil de aminoácidos encontrados nas microalgas tem ganhado interesse devido à presença de aminoácidos essenciais e ao grande poder emulsificante (SAFI *et al.*, 2014). Seyfabadi *et al.* (2011) no cultivo de *Chlorella vulgaris* com alta intensidade de luz ( $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fotoper\u00edodo 16:8 apresentou aumento de proteínas (44%) em compara\u00e7\u00e3o com baixa intensidade de luz ( $37,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fotoper\u00edodo de 8:16 com valor de proteínas de 33%.

## Carboidratos

Os Carboidratos s\u00e3o polissacar\u00eddeos composto de amido e celulose, que representam uma importante por\u00e7\u00e3o da biomassa de microalgas. Apresenta-se como carboidrato de armazenamento e estrutural. Os polissacar\u00eddeos de armazenamento est\u00e3o apresentados na forma de amido, glicog\u00eanio, paramylon (res\u00edduos de glicose), crisolaminarina e amido rico em amilopectina (Figura 4). Podem ser encontrados em microalgas e cianobact\u00e9rias. Na c\u00e9lula, o amido normalmente \u00e9 armazenado nos cloroplastos, o amido rico em amilopectina, o glicog\u00eanio e o paramylon est\u00e3o em gr\u00e2nulos no citosol e a crisolaminarina nos vac\u00f3olos das c\u00e9lulas (BERNAERTS *et al.*, 2019).

Os polissacar\u00eddeos estruturais s\u00e3o ligados \u00e0 parede celular, com fun\u00e7\u00e3o estrutural e  $\beta$ 1-3 glucano, que traz benef\u00edcios \u00e0 sa\u00fade, compostos por v\u00e1rios res\u00edduos de monossacar\u00eddeos. Representa cerca de 10% da biomassa seca, sendo que os carboidratos totais podem atingir 12 – 55% do peso de biomassa seca em meio com limita\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio (BERNAERTS *et al.*, 2019; SAFI *et al.*, 2014). Mata *et al.* (2020) encontraram aproximadamente 42% de carboidratos em cultivo de *Spirulina* sp. LEB18 em \u00e1guas residuais do processo de dessaliniza\u00e7\u00e3o.



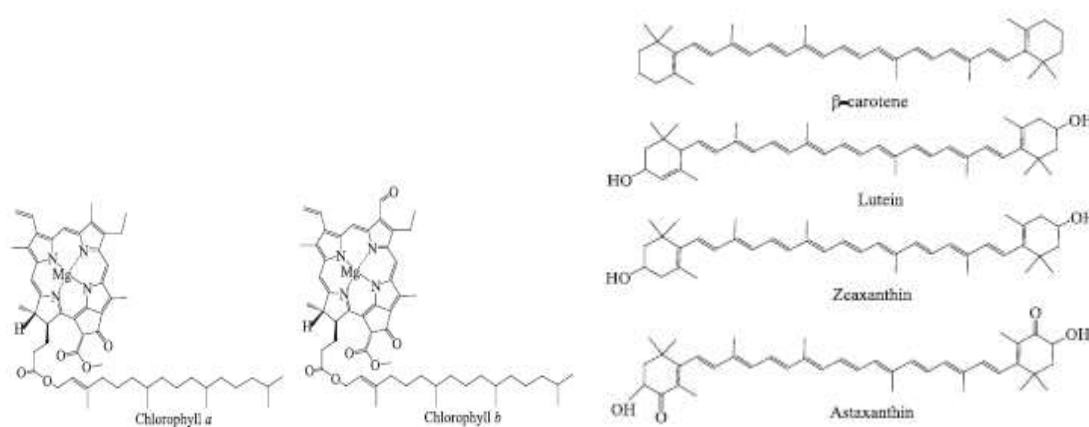
**Figura 4** – Estruturas de polissacarídeos de armazenamento. *Fonte: Bernaerts et al., 2019*

## Pigmentos

Um dos pigmentos mais importantes da *Chlorella* é a clorofila, que representa cerca de 1 – 2% do seu peso seco. Apresentam também, outros pigmentos, como: carotenoides, como  $\beta$ -caroteno associados aos lipídios no cloroplasto, carotenoides primários associados à clorofila nos tilacóides, onde ocorre a transferência de energia para fotossíntese, cantaxantina, astaxantina, luteína, violaxantina e feofitina *a* e *b* (Tabela 3). Alguns pigmentos como os antioxidantes atuam como protetores ao excesso de luz que as microalgas se submetem e a forte exposição à radiação e ao oxigênio. Esses pigmentos previnem doenças crônicas e fortificam o sistema imune (SAFI *et al.*, 2014; CORONADO-REYES *et al.*, 2020).

A qualidade da irradiação de luz é importante para absorção da clorofila e outros pigmentos, como carotenoides. Seyfabadi *et al.* (2011) observaram que o conteúdo de clorofila *a* diminuiu com aumento da irradiação ( $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fotoper\u00edodo (16:8), no entanto, os valores de  $\beta$ -caroteno aumentou nas mesmas condi\u00e7\u00f5es. A defici\u00eancia de nitrato prejudica a produ\u00e7\u00e3o de clorofila, j\u00e1 a produ\u00e7\u00e3o de

componentes energéticos, como lipídios, carboidratos e pigmentos como carotenoide aumenta (SERRA *et al.*, 2020).



**Figura 5** – Estrutura dos principais pigmentos encontrados nas microalgas. **Fonte:** D’Alessandro; Antoniosi Filho, 2016.

**Tabela 3** – Conteúdo potencial de pigmentos em *Chlorella vulgaris* em diferentes condições de crescimento

Pigmentos	$\mu\text{g g}^{-1}$
$\beta$ -caroteno	7 – 12.000
Astaxantina	550.000
Cantaxantina	362.000
Luteína	52 – 3.830
Clorofila <i>a</i>	250 – 9.630
Clorofila <i>b</i>	72 – 5.770
Feofitina <i>a</i>	2310 – 5640
Feofitina <i>b</i>	Não determinado
Violaxantina	10 – 37

**Fonte:** Safi *et al.*, 2014

## Minerais

Os minerais exercem papel importante para os seres vivos, são determinados após a incineração da biomassa. Em *Chlorella vulgaris* o perfil de minerais está apresentado na Tabela 4. Alguns elementos, como o potássio é encontrado normalmente na forma catiônica, mas pode se ligar ao  $\text{HCO}_3^-$  e ao  $\text{SO}_4^{2-}$ , estando relacionado ao metabolismo de carboidratos, ao equilíbrio intracelular e síntese proteica, além de ser

utilizado como fertilizante. Já o zinco é necessário para o crescimento da maioria das microalgas, é um componente essencial das enzimas carboxilases, que participa da síntese de carboidratos, proteínas e lipídios, e está envolvido na proteção contra a oxidação (SAFI *et al.*, 2014; FOZ; ZIMBA, 2018).

As microalgas apresentam alto teor de cinzas e essa alta concentração pode ser atribuída a metais como Na e K, presentes na água residual que pode ter sido absorvida nas células das microalgas (GAI *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2020). Em concentrações elevadas alguns metais, como cádmio (Cd), cobre (Cu) e níquel (Ni) podem ser tóxicos para as microalgas e seu metabolismo, com inibição da fotossíntese e mutação. No entanto, Cu, ajuda no melhor rendimento de biomassa e no valor de lipídios das microalgas, e juntamente com o Ni, em concentrações adequadas podem contribuir para o metabolismo da microalga. Outro elemento importante é o ferro, que fornece suporte para absorção de nitrogênio, responsável por regular o acúmulo de lipídios, participar da síntese de DNA e da respiração (DUARTE *et al.*, 2016; SUASTES-RIVAS *et al.*, 2020).

**Tabela 4** – Perfil de minerais em *Chlorella vulgaris*

Minerais	g 100g <sup>-1</sup>
Na	1,35
K	0,05 – 2,15
Ca	0,16 – 0,59
Mg	0,34 – 0,44
P	0,96 – 1,76
Cr	Traço
Cu	0,19
Zn	0,55
Mn	0,40
Se	Traço
I	0,13
Fe	0,20 – 0,68

*Fonte:* Adaptado Safi *et al.*, 2014

### 3.2 Biotecnologia de biocombustíveis

A crescente necessidade energética tem aumentado o consumo mundial de combustíveis fósseis (SEVDA *et al.*, 2016). A maior fonte de energia é derivada do petróleo, como gás natural e carvão, que proporcionam agravos ambientais. Os combustíveis fósseis contribuem com 88% do consumo mundial de energia (REYIMU; OZÇIMEN, 2017; PRIYANKA *et al.*, 2020). E tem causado grandes impactos ambientais como poluição, com emissão de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O e com o aquecimento global (DELIISMAIL *et al.*, 2018; ENAMALA *et al.*, 2018). Assim, cresce o interesse em fontes de energia renovável e sustentável, como os biocombustíveis (GAI *et al.*, 2015; PRIYANKA *et al.*, 2020).

Os biocombustíveis são classificados em três gerações: a primeira é derivada de fonte vegetal; a segunda geração derivado de resíduos agrícolas, madeiras; e a terceira geração derivado das microalgas – Figura 6 (ENAMALA *et al.*, 2018). Os biocombustíveis de primeira geração usam culturas alimentares, como mandioca, beterraba, trigo, soja, milho e colza, transformando em biogás de milho, bioetanol de trigo e biodiesel de óleo de vegetais. Seu uso para a produção de biocombustíveis causou críticas, devido ao aumento do preço dos alimentos, pela maior demanda agrícola e necessidade por terras aráveis, competindo com a indústria de alimentos (REYIMU; OZÇIMEN, 2017; ARANSIOLA *et al.*, 2013).

Os biocombustíveis de segunda geração, cuja matéria-prima é a biomassa de resíduos agrícola, de óleos não comestíveis e resíduos florestais lignocelulósico, resolve o problema do impasse alimento versus combustível. No entanto, a demora no crescimento das lavouras e na produção de biomassa, além de alto custo de produção, pela necessidade de pré-tratamentos, colheita e purificação da matéria-prima fizeram diminuir o interesse de biocombustíveis pela segunda geração, aumentando os estudos para a terceira geração. Esta geração obtém combustível através da biomassa de microalgas, que tem rápido crescimento, são adaptáveis em diferentes águas, inclusive água residual, tem alta produtividade, necessitam de pouca área de cultivo e são fixadores de CO<sub>2</sub>. No entanto, o custo em larga escala ainda é um obstáculo e o sucesso do uso de biomassa de microalgas também depende da viabilidade econômica, técnica e ambiental e aceitação social (REYIMU; OZÇIMEN, 2017; MONDAL *et al.*, 2019; SARANYA; RAMACHANDRA, 2020).

As microalgas são recursos potenciais para a produção de biocombustíveis, por não serem sazonais como as outras plantas terrestres, terem processo de cultivo simples, e conteúdo de biomassa rica em lipídios e carboidratos (DELIISMAIL *et al.*, 2018; KHATOON *et al.*, 2017). Além disso, a biomassa de microalgas tem menores temperaturas de decomposição no processo de combustão, assim, apresenta maior reatividade (GAI *et al.*, 2015). A desvantagem de utilizar essa matéria-prima está relacionada à produção em larga escala, devido à necessidade de alta concentração de biomassa, resultante do tamanho celular e meio aquoso que as microalgas se desenvolvem e ao custo operacional (VOOREN *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2016; DELIISMAIL *et al.*, 2018; YUN *et al.*, 2019).



**Figura 6** – As diferentes gerações de biocombustíveis. *Fonte: Adaptado Sabino et al., 2021.*

### 3.2.1 Biodiesel

O biodiesel é um éster alquílico de cadeia longa, que emite baixa concentração de CO e CO<sub>2</sub>. A principal produção de biodiesel no Brasil é de soja, no entanto, o interesse pelo uso das microalgas tem crescido (CHI *et al.*, 2018; D’ALESSANDRO, ANTONIOSI FILHO, 2018). A produção de 50g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> de biomassa de microalgas pode produzir 10.000 galões de óleo-acre-ano, contra a soja que produz apenas 48 galões de óleo-acre-ano. A produção de biodiesel por microalgas representa uma produção de energia mais limpa, com menor impacto ambiental. Porém, o alto custo de produção dificulta a competitividade com as fontes de combustível fóssil (SINGH *et al.*, 2016; SAFI *et al.*, 2014). O principal custo de produção de biodiesel é com matéria-prima, cerca de 77% do custo refere-se ao cultivo da microalga, 12% da colheita, 8% da

extração e os custos de conversão é de 10% para grandes instalações e 25 a 40% em pequenas instalações. Para ser competitivo o custo tem que ser reduzido em 10 vezes da produção de petróleo (GE *et al.*, 2018; ARANSIOLA *et al.*, 2013).

A escolha da espécie de microalgas depende da facilidade do cultivo, da alta produção de lipídios e da alta proporção de ácidos graxos adequados para a produção (ANTO *et al.*, 2019). A microalga do gênero *Chlorella* é amplamente usada na produção de biodiesel devido à facilidade de cultivo e ao rápido crescimento. No entanto, a *Chlorella* produz apenas 14-30% do teor de lipídios, normalmente (HU *et al.*, 2019). Em determinadas condições, como estresse devido ao esgotamento de nitrogênio, intensidade da luz, concentração de sal, concentração de ferro e temperatura, as microalgas alteram as vias de síntese dos lipídios, que pode ser convertido em biodiesel (HU *et al.*, 2019).

O biodiesel tem o potencial de substituir a economia atual do petróleo, já que pode ser adicionado ao diesel de petróleo e usado em motores a diesel existentes (SHEKH *et al.*, 2015). A emissão de CO<sub>2</sub> pelo biodiesel é 78,45% menor do que o diesel do petróleo. Uma mistura com 20% de biodiesel pode diminuir as emissões líquidas de CO<sub>2</sub> em 15,66%. O biodiesel apresenta vantagens por ser biodegradável, reduzir a emissão de gases do efeito estufa e pode ser usado em qualquer proporção nos motores convencionais sem necessidade de adaptações. O biodiesel é menos volátil do que o óleo diesel e mais seguro para transporte (NASCIMENTO *et al.*, 2013; TEO *et al.*, 2014; SIRIN; SILLANPÄÄ, 2015).

As principais propriedades do biodiesel são determinadas pela composição de ésteres metílicos de ácido graxos (NIEMI *et al.*, 2019; SAFI *et al.*, 2014). A qualidade do biodiesel está relacionada a baixos teores de oxigênio para evitar reações de oxidação, que tornam o combustível instável (SIMÃO *et al.*, 2018). Os principais ésteres metílicos para a produção de biodiesel são C16:0; C18:0; C18:1; C18:2 e C18:3. Normalmente, as microalgas produzem os ácidos graxos C16:0 e C18:1. A alta qualidade de biodiesel, também está relacionada com altos índices de cetano, baixo valor de iodo e baixo valor do ponto de entupimento do filtro frio (SHIN *et al.*, 2018). E outros parâmetros também são analisados, como: valor de saponificação (VS), grau de insaturação (GI), fator de saturação de cadeia longa (FSCL), viscosidade, valor calorífico e estabilidade oxidativa (CARDOSO *et al.*, 2020; MONDAL *et al.*, 2019).

A composição de ácidos graxos influencia diretamente na qualidade de biodiesel. Assim, alta proporção de saturados e monoinsaturados é desejável, pois os ácidos graxos saturados são resistentes a autoxidação e os insaturados aumentam as características do fluxo de frio (WU; MIAO, 2014). Além disso, a qualidade de biodiesel em microalgas também está associada à presença de clorofila, pois a clorofila no produto final proporciona cores opacas ao biodiesel, que diminui a eficiência de transesterificação, combustão e de armazenamento. Uma das alternativas é a remoção da clorofila com NaOH, antes da extração de lipídios (SANDANI *et al.*, 2020).

### 3.2.3 Bioetanol

O bioetanol é considerado um combustível sustentável e renovável com caminho promissor na atualidade. Foi usado pela primeira vez em 1900, mas devido ao alto custo de produção, comparado ao petróleo, foi interrompido em 1970 pela crise do óleo. Apresenta alto número de octanagem (108), menor emissão de CO<sub>2</sub> (até 80%), porém, 68% menor conteúdo energético do que o petróleo (ADITIYA *et al.*, 2016).

O bioetanol pode ser produzido de vegetais, como a cana de açúcar (primeira geração) rico em glicose e amido, degradados por moagem e hidrolisados para polissacarídeos; de resíduo de matéria lignocelulósica (segunda geração), compostos de celulose, hemicelulose e lignina; e pela biomassa de microalgas (terceira geração), obtido pela fermentação de carboidratos presentes nas microalgas (MAIA *et al.*, 2020).

Para aumentar a produção de bioetanol é necessário aumento do teor de carboidratos e maior produtividade de biomassa. Algumas espécies acumulam carboidratos dentro de suas células, nas camadas externas da parede celular (pectina, alginato e ágar), na camada interna da parede celular (celulose e hemicelulose) e dentro das células (amido). O carboidrato da biomassa de microalgas é hidrolisado mais rápido do que de outros vegetais lignocelulósicos, pois não apresenta lignina, diminuindo o custo em pré-tratamentos. O bioetanol é um biocombustível que apresenta melhor operação do motor, alta biodegradabilidade e combustão mais limpa (MAIA *et al.*, 2020). A desvantagem do bioetanol de microalgas é o efeito corrosivo, a baixa pressão de vapor, o baixo brilho de chama e sua miscibilidade em água (OZÇIMEN *et al.*, 2020).



### 3.3 Águas residuais e Biorremediação

O crescimento da população mundial aumentou o volume de águas residuais e a necessidade por tratamentos adequados, para o descarte desses resíduos. Em 2014 foi relatado o consumo de aproximadamente 3.700 bilhões de m<sup>3</sup> de água doce no mundo e a maior parte desse valor transformada em águas residuais, devido às atividades domésticas, esgotos, agricultura e efluentes industriais. A água residual não tratada ao ser descartada contamina as águas limpas, pois libera quantidade de nitrogênio e fósforo que causa a eutrofização e efeitos nocivos a saúde humana (SHAHID *et al.*, 2019). No entanto, esses nutrientes em quantidades adequadas favore o crescimento de microalgas. Essas águas podem conter também matéria orgânica rica em contaminante, que afetam o crescimento e a produção de biomassa, mas que podem ser utilizados como meio de cultura para as microalgas, devido seu grande poder biorremediador (ARAVANTINO *et al.*, 2013).

Estima-se que em 2030 ocorra a deficiência de recursos hídricos em até 40%, em todo o mundo, devido ao aumento da demanda de água, a contaminação crescente dos rios e lagos e pela falta de tratamento adequado das águas residuais. Por isso, o interesse no uso de águas residuais para o crescimento de microalgas, pois diminui ou elimina o uso de água doce, reduz o custo com suplementação de nutrientes e assimila poluentes orgânicos e inorgânicos presentes (SINGH *et al.*, 2016). Portanto, o uso de água residual fornece duplo benefício, tratamento da água e produção de biomassa de alto valor agregado (LAM *et al.*, 2017).

As águas residuais precisam de tratamento adequado para o descarte sem problemas ambientais, evitando compostos tóxicos em corpos d'água. Segundo a US EPA, 3 a 4% do total de energia consumida nos EUA é utilizado para tratamento de água, liberando 45 milhões de toneladas de gases de efeito estufa por ano, pela técnica de lodo ativado. Os métodos de tratamento de águas residuais incluem métodos físico-químicos, que apresentam grande eficiência na remoção de sólidos e matéria orgânica, no entanto, para remoção de nutrientes ainda há deficiências. O método biológico tem ganhado interesse, principalmente com uso de microalgas (OTONDO *et al.*, 2018; ALMOMANI *et al.*, 2019).

A vantagem do tratamento biológico é a capacidade das microalgas em metabolizar compostos orgânicos e inorgânicos, além de participar do processo de bioacumulação e biosorção, incluindo de metais pesados (SERRA *et al.*, 2020). Além de fixar gás carbônico, que é um gás do efeito estufa, remover nitrogênio e utilizar o carbono para a produção de biocombustíveis, cosméticos e nutracêuticos (SOUSA *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2017).

A industrialização teve como consequência negativa a contaminação ambiental por metais pesados. Alguns desses metais como: zinco, cobre, chumbo, cádmio, cromo e mercúrio são liberados pelas indústrias químicas, de mineração, metalurgia, galvanoplastia, de bateria, pintura, fertilizantes e de curtume (VIDYALAXMI *et al.*, 2019). Segundo a Agência de proteção ambiental da União europeia o limite máximo de As, Cd, Cr, Hg e Pb são 0,01; 0,005; 0,1; 0,002 e 0,015 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Mesmo em baixas concentrações são altamente tóxicos, carcinogênicos, mutagênico e tetragênico (LEONG, CHANG, 2020). A presença de metais pesados inibe o crescimento e a produtividade de microalgas. Além de aumentar o risco de contaminação dos bioprodutos. No entanto, a presença de alguns desses metais aumenta a produção de lipídios e carboidratos (LU *et al.*, 2019).

A remoção de metais pesados também pode ser realizada através de tratamentos físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos e químicos, como precipitação, filtração, flotação, floculação e métodos eletroquímicos são de alto custo operacional, necessitam de grande demanda energética, tem baixa eficiência a depender da concentração do metal (acima de 100 mg L<sup>-1</sup>) e formam resíduo tóxico, que precisam de descarte adequado (VIDYALAXMI *et al.*, 2019; LEONG, CHANG, 2020). No entanto, o tratamento biológico, com microalgas, é uma alternativa ao menor impacto ambiental e menor formação de resíduo tóxico (VIDYALAXMI *et al.*, 2019).

O efeito tóxico dos metais pesados encontrado nas águas residuais é reduzido pela espécie reativa de oxigênio, desenvolvido pelas microalgas. Microalgas induzem a ação de vários mecanismos extra e intracelular com produção de enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos como: catalase, glutathione redutase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, ácido ascórbico, cisteína, prolina, carotenoides e glutathione com baixo peso molecular. Alta concentração de ácido ascórbico produzido pela microalga corresponde a proteção celular contra ameaça oxidativa. Além disso,

altos níveis de glutathione também protege a microalga e favorece a tolerância para eliminar radicais livres. No entanto, em altas concentrações de metais ocorrem danos celulares, pois os níveis de espécies reativas ultrapassam a capacidade da célula. No entanto, em nível mais baixo de metais pesados as microalgas conseguem acumular esses elementos, formando fitoquelatinas (SINGH *et al.*, 2016; LEONG, CHANG, 2020).

A utilização de microalgas como biorremediador tem ganhado interesse para o tratamento de águas residuais ricas em pesticidas, elementos tóxicos, produtos farmacêuticos e industriais, pois utilizam matéria orgânica dessas águas residuais como fonte de nutrientes e de carbono, reduzindo a toxicidade, removendo poluentes e proporcionando biomassa de alto valor agregado (NIE *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2019). Muitos microrganismos têm a capacidade de degradar contaminantes de hidrocarboneto, utilizando a via mono-oxigenase e dioxigenase (LIU *et al.*, 2019). A eficiência de remoção de nutrientes em águas residuais está relacionada a redução da demanda química de oxigênio, de nitrogênio, fósforo, amônio e nitratos, que podem inibir o crescimento da microalga (LU *et al.*, 2019). Diferentes tipos de microalgas tem sido eficientes em tratamento de águas residuais, como: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* em meio autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (ZHAI *et al.*, 2017).

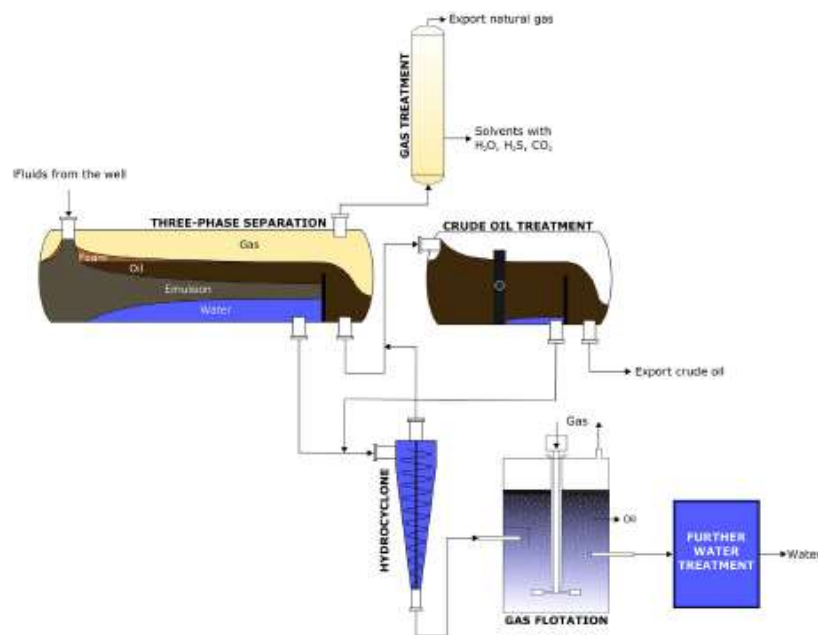
O cultivo de microalgas em águas residuais tem sido a melhor opção para o reúso da água para consumo e agricultura, sendo um benefício econômico adicional. A *Chlorella* se adapta bem nesse meio, pois são bem tolerantes a grandes quantidades de CO<sub>2</sub>, devido a capacidade de absorver nitrogênio e fósforo, na redução da DQO e possuem alta produtividade de biomassa e lipídios. Além, da capacidade de absorção de metais pesados e outros compostos tóxicos (KUMAR *et al.*, 2017; SAFI *et al.*, 2014).

O custo da produção de biomassa de microalgas é elevado, cerca de 5 euros por quilo, mas pode ser reduzido para 1 euro por quilo quando associado ao uso de águas residuais industriais, florestais e municipais (CARDENAS, 2018; REYIMU; OZÇIMEN, 2017). A maior desvantagem do uso de água residual como meio de cultivo de microalgas é a presença de metais pesados e substâncias tóxicas que dificulta o crescimento normal das microalgas (SINGH *et al.*, 2016). Além da presença de outros microrganismos como bactérias, que pode competir por nutrientes (ZHOU *et al.*, 2019).

No entanto, vários estudos relatam o papel biorremediador das microalgas, em águas residuais. Contudo, as espécies das microalgas influenciam na eficiência do tratamento, sendo mais utilizadas a *Chlamydomonas*, *Chlorella* e *Scenedesmus* na remoção de contaminantes (SHAHID *et al.*, 2019).

### 3.4 Água produzida (AP)

Uma das atividades mais importantes na indústria química é a exploração de petróleo. O processo de extração de óleo gera uma grande quantidade de água residual, conhecida como água produzida (ARRIADA; ABREU, 2014). A água produzida é um subproduto da produção de óleos, gás, carvão e gás de xisto (Figura 7). É uma mistura de água injetada, com hidrocarbonetos, compostos inorgânicos, podendo conter microrganismos e resíduos químicos que são adicionados para evitar a corrosão, sequestradores, dispersantes, biocidas e disjuntores de emulsão, e água do mar quando em processos *offshore*. A composição da AP muda dependendo da região do poço, idade, tipo de óleo produzido, condições físicas e químicas do processo e da injeção de água. (DUDEK *et al.*, 2020; MOTTA *et al.*, 2013). Um poço novo produz de 5 a 15% em volume de AP e um poço antigo de 75 a 90% em volume de AP (MOUSA, 2016). Durante a extração de óleo, a taxa da água para a de óleo chega a aproximadamente 3:1. No entanto, é esperada uma taxa de água e óleo de 12:1 para 2025 (JIMÉNEZ *et al.*, 2018).



**Figura 7** – Processo de separação da água produzida, do óleo e gás natural. *Fonte: Dudek et al., 2020.*

A água produzida é uma mistura de compostos solúveis e insolúveis em água (Tabela 5), que se não for tratada adequadamente causa grandes consequências ambientais, como aumento da salinidade, dispersão de óleo nos ecossistemas, dispersão de compostos químicos, metais pesados e radionuclídeos no ambiente (MOUSA, 2016). Dentre os componentes orgânicos presentes os aromáticos de baixo peso molecular como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), hidrocarboneto policíclico aromático (PAH), os fenóis e aromáticos heterocíclico são os mais tóxicos. Alguns metais encontrados na AP podem aumentar o nível de toxicidade da água como cobalto, cobre, cádmio, chumbo, níquel e mercúrio (DUDEK *et al.*, 2020; AL-GHOUTI *et al.*, 2019).

A AP pode conter também óleos (1000 ppm, com tamanho de gotículas menor que 100 a 150  $\mu\text{m}$ ), gases dissolvidos e matéria inorgânica (carbonato de ferro, carbonato de cálcio, sulfato de bário, sulfato de cálcio, sulfato de estrôncio, vários óxidos, silicatos e fosfatos) (DUDEK *et al.*, 2020; MANSOUR *et al.*, 2020). Devido a grande quantidade de compostos encontrados na AP vários tratamentos têm sido pesquisados para o descarte sustentável. O tratamento é importante para o reuso da água na agricultura ou na indústria, com objetivo de remoção dos sólidos dissolvidos, óleos e

graxas, sólidos suspensos, compostos orgânicos dissolvidos, sais, gases e microrganismos. O método de tratamento escolhido, normalmente é o de menor custo, que depende da capacidade da microalga, qualidade de remoção, preço de eletricidade e se é *onshore* ou *offshore* (AL-GHOUTI *et al.*, 2019).

**Tabela 5** – Principais componentes e suas concentrações da água produzida

Parâmetros	Concentração mg L <sup>-1</sup>	Parâmetros	Concentração mg L <sup>-1</sup>
Demanda química de oxigênio (COD)	1220 - 2600	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0 – 15.000
Sólido suspenso total (TSS)	1,2 - 1000	Cl <sup>-</sup>	0 – 270.000
Carbono orgânico total (TOC)	0 - 1500	Na	0 – 150.000
Sólido dissolvido total (TDS)	100 - 400.000	Sr	0 – 6.250
Ácidos orgânicos	0,001 – 10.000	Zn	0,01 – 35
Benzeno	0,032 – 778,51	Li	0,038 – 64
Etilbenzeno	0,026 – 399,84	Al	0,4 – 410
Tolueno	0,058 – 5,86	As	0,002 – 1,1
Xileno	0,01 – 1,29	Ba	0 – 850
Total BTEX	0,73 – 24,1	Cr	0,002 – 11
Hidrocarbonetos saturados	17 – 30	Fe	0,1 – 1.100
Total de óleo e graxas	2 – 560	Mn	0,004 – 175
Fenol	0,001 – 10.000	K	24 – 4300
Ca <sup>2+</sup>	0 – 74.000	Pd	0,008 – 0,88
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0 – 15.000	Ti	0,01 – 0,7
Mg <sup>2+</sup>	0,9 – 6.000	B	5 – 95

**Fonte:** Al-Ghouti *et al.*, 2019

O uso de AP para o cultivo de microalgas é uma alternativa de redução do custo com água fresca e para o reuso de AP. Os compostos presentes na AP podem ser tóxicos para as microalgas, como componentes orgânicos, derivados de hidrocarbonetos, aditivos químicos (surfactantes, metanol, biocidas, cloreto de potássio) e metais traços (GRAHAM *et al.*, 2017). No entanto, algumas microalgas e outros microrganismos conseguem se desenvolver em altos níveis de hidrocarbonetos, salinidade e na presença de metais pesados (AMMAR *et al.*, 2018). Rakhmadumila; Muntalif (2020) em cultivo de *Chlorella* sp em AP artificial obteve biomassa de 2,506 g L<sup>-1</sup> (25% AP); 0,53 g L<sup>-1</sup> (50% AP); 1,22 g L<sup>-1</sup> (75% AP) e 0,86 g L<sup>-1</sup> (100% AP). E Ammar *et al.* (2018) em cultivo de *Isocrysis galbana* apresentou produção de biomassa

de 0,899; 0,638 e 0,314 g L<sup>-1</sup>, para 10, 25 e 50% de AP, respectivamente. E produção de biomassa de *Nannochloropsis oculata* de 1,0166; 0,856 e 0,31 g L<sup>-1</sup>, para 10, 25 e 50% de AP, respectivamente.

O tratamento da água produzida tem grande importância nas questões ambientais e operacionais. O destino da água produzida pode ser reuso (tratamento bem específico, visando à qualidade da água para o uso na pecuária, alimentação animal, aquicultura e irrigação), a reinjeção (mais adequado para a AP, pois elimina parcialmente, o resíduo gerado, transformando-o em matéria-prima para o próprio processo) e o descarte (MOTTA *et al.*, 2013). O descarte direto dessas águas residuais seria um perigo para o meio ambiente, devido à presença de vários contaminantes (SEVDA *et al.*, 2016). No Brasil, o descarte deve atender as exigências do Conama 393 (MOTTA *et al.*, 2013).

O tratamento da AP deve seguir a legislação local, a viabilidade técnica, ao local de produção (*offshore* ou *onshore*), disponibilidade de equipamentos, custo e destino dessa água (MOTTA *et al.*, 2013). Pode ser físico, químico e biológico, no entanto, a combinação desses diferentes métodos seria o ideal para redução de diferentes poluentes (AL-GHOUTI *et al.*, 2019). Normalmente, o tratamento envolve três etapas, a primeira é o pré-tratamento, onde ocorre remoção de partículas grandes de óleo, graxas, bolhas de gás, partículas sólidas e redução dos contaminantes. A segunda etapa é o tratamento principal, engloba o tratamento primário e a remoção de pequenas partículas de óleo, fração de óleo e sólidos suspensos. E a última etapa, envolve a remoção de gotículas menores de óleo, usando flotação, hidrociclones e centrífugas, e remoção de hidrocarbonetos dispersos (<10 mg L<sup>-1</sup>), com filtros duplos de cartucho e membrana. O tratamento algumas vezes envolve a remoção de matéria orgânica dissolvida, hidrocarbonetos e gases (<5 mg L<sup>-1</sup>) (AL-GHOUTI *et al.*, 2019; BAGHERI *et al.*, 2018).

Outros tratamentos como oxidação eletroquímica, processos de membrana, adsorção por carvão ativado, dissolução, dispersão, evaporação, floculação, filtração biodegradação e processos de oxidação avançados são utilizados. No entanto, existem desvantagens nessas técnicas, a maioria apresenta alto custo, baixa eficiência e geração de resíduos secundários, até para biodegradação tem desvantagem, pela lentidão do processo (MOUSA, 2016; RAJAN *et al.*, 2019; GRAHAM *et al.*, 2017). Normalmente,

tratamentos biológicos em águas residuais tem sido o tratamento mais requisitado pelas questões de custo e de menor impacto ambiental, comparado com outros métodos (NIE *et al.*, 2020).

A proposta de tratamento utilizando métodos biológicos em espaços *offshore* torna-se limitado pela necessidade de implantação de biorreatores, no entanto, esse método para os processos *onshore* é uma alternativa para redução de custos e eficiência na remoção de matéria orgânica e inorgânica (SUDMALIS *et al.*, 2018). Entre os microrganismos utilizados para esse método de tratamento bactérias, fungos, leveduras e microalgas são aplicados. As microalgas se destacam, pois conseguem crescer em ambientes adversos, podem limpar expressivamente efluentes e ainda produz biomassa que pode servir como matéria prima para a produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (RAHMAN *et al.*, 2020).

As cepas de microalgas usadas para tratamento de água inclui *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Monoraphidium* (AL-GHOUTI *et al.*, 2019). Os tipos de tratamento bem como o custo dependem dos poluentes encontrados na AP e do uso, assim, tratamentos mais específicos e eficientes são necessários. Podendo ser usado para irrigação, ambiente industrial, animais, consumo humano e utilização em incêndios (ATIA *et al.*, 2019).

### 3.5 Considerações finais

As microalgas são organismos fotossintéticos, existentes a bilhões de anos, que podem crescer em diferentes ambientes e tem uma biomassa composta de bioprodutos de alto valor agregado. Elas apresentam diferentes tipos de cultivo, em sistemas abertos ou fechados, devendo ser escolhidos a depender da espécie e do objetivo de uso. As condições de cultivo, como luminosidade, temperatura, CO<sub>2</sub>, presença de nutrientes, pH e aeração interferem no seu crescimento, produção, composição e metabolismo. Dentre as microalgas com grande potencial biorremediador e altos valores de proteínas, lipídios e carboidratos se destacam a *Chlorella*.

A biomassa de microalgas pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis. Por apresentarem eficiência fotossintética e pelo rico conteúdo de carboidratos e lipídios utilizados para a produção de biodiesel e bioetanol. Os



biocombustíveis se destacam pela redução da emissão de gases do efeito estufa em comparação com o combustível de petróleo e por serem uma fonte de energia renovável. Podem ser classificadas em 3 gerações, derivada de fonte vegetal, de resíduos agrícolas e de biomassa de microalgas. O interesse de biocombustível de microalgas ocorre devido ao seu cultivo simples e rápido, por não utilizarem terras aráveis, pela capacidade das microalgas de fixar CO<sub>2</sub> e por crescerem em diferentes meios, inclusive em águas residuais.

As microalgas apresentam grande capacidade de crescimento em águas residuais, pela capacidade de absorção de metais pesados, de fixar CO<sub>2</sub>, reduzir a demanda química de oxigênio e converter compostos complexos tóxicos em estruturas mais simples. Uma das águas residuais utilizadas no cultivo é a água produzida, um efluente importante no processo de extração de petróleo, que necessita de tratamento e descarte adequado. É uma mistura de água injetada, hidrocarbonetos, resíduos químicos, compostos orgânicos e inorgânicos, óleos e graxa, que tem aumentado o volume ao longo dos anos. As microalgas podem crescer em AP, no entanto, trata-se de um recurso desafiador pela composição e complexidade adicional que depende da região da extração de óleo.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta e composição química da água produzida**

A água produzida foi coletada no município de Santo Amaro das Brotas (latitude 10°46'44'' sul; 37°3'30'' Oeste) localizado a 41 km da capital Aracaju, estado de Sergipe (SE), Brasil, fornecida por uma empresa de exploração de petróleo da região, transportadas para a Universidade Federal da Bahia (UFBA) em vasos de polipropileno estéreis sob refrigeração, e armazenadas a -20 °C até sua utilização.

As características físico-químicas (Tabela 1) da água produzida foram determinadas: Cloreto (Cl<sup>-</sup>) pelo método SM4500C1B; Sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) por SM4500E; Chumbo (Pb), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Vanádio (V), Selênio (Se), Titânio (Ti), Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Cromo (Cr) pelo método SM3120B; Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e Carbonato de sódio (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) por SM2320A/B; Hidrocarbonetos totais de petróleo

(HTP) EPA8015D; Hidrocarbonetos policíclico aromático (HPA) EPA8270D; pH SM4500(H<sup>+</sup>)B; salinidade SM2520C; óleos e graxas totais SM2520C e sólidos totais dissolvidos (STD) SM2540. As características físico-químicas e os metais presentes foram analisados usando os métodos padrão para análise de água e esgoto (RICE; BRIDGEWATER, 2012) e por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivo acoplado (ICP-OES) SM3120B.

#### 4.2 Microalga e aclimação do inóculo

A cepa de *Chlorella vulgaris* foi obtida do banco de Microalgas Iracema Nascimento do laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Para obtenção do inóculo a ser utilizado nos experimentos a cepa foi cultivada em meio sintético, autoclavado, BG-11 (NaHCO<sub>3</sub>; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O; NaNO<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; (NH<sup>+</sup>)<sub>5</sub>Fe(C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> e EDTA) e elementos traços (RIPPKA *et al.*, 1979), em fotobiorreatores tipo Erlenmeyer, com aeração constante, realizada por bombas de injeção de ar, com temperatura controlada a 28 °C. O inóculo foi submetido a fotoperíodo contínuo (24h) com iluminação fornecida por cinco lâmpadas fluorescentes com 41,60 μmol fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>cada. Após 18 dias de cultivo, os inóculos foram centrifugados (Eppendorf 5702 R) a 4400 rpm durante 4 minutos, para em seguida serem utilizados nos experimentos.

#### 4.3 Condições de cultivo e tratamentos

As mesmas condições de cultivo do inóculo foram empregadas para todos os tratamentos, incluindo o fotoperíodo de 24 horas e exceto o processo de esterilização. Os experimentos foram conduzidos em fotobiorreatores tipo Erlenmeyer (1 L) com volume útil de 800 mL, concentração inicial de aproximadamente 0,2 g L<sup>-1</sup>, em triplicata, com duração de 18 dias. Os tratamentos consistiram de um cultivo controle (meio sintético BG-11) e tratamentos contendo 30% AP + 70% BG-11 (AP30%); 40% AP + 60% BG-11 (AP40%) e 50% AP + 50% BG-11 (AP50%), de acordo com Moraes e Costa (2007) com modificações.

Após 18 dias de cultivo a biomassa foi recuperada por centrifugação (Eppendorf 5702 R) a 4400 rpm durante 4 minutos, lavada com água destilada e centrifugada novamente (4400 rpm durante 4 minutos) para remoção dos sais e interferentes. Em seguida armazenada a -80 °C para secagem em liofilizador (L101 - Liobras) para realização das análises posteriores (ANDRADE *et al.*, 2019).

#### 4.4 Crescimento e pH

A concentração de biomassa ( $X$ , g L<sup>-1</sup>) foi determinada em todos os cultivos de microalgas com o valor da densidade ótica, através da curva padrão previamente estabelecida (COSTA *et al.*, 2002), utilizando espectrômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) com comprimento de onda 680 nm, realizado diariamente. A produtividade ( $P$ , g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) foi determinada pela equação (1) e a taxa de crescimento ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) foi realizada pela regressão linear da curva de produção de biomassa, na fase log (JESUS *et al.*, 2018). O pH foi medido diariamente com uso de pHmetro digital (Gehaka PG2000).

$$P = (X_t - X_0) / (t - t_0) \quad (1)$$

$X_t$  e  $X_0$  representam as concentrações de biomassa (g L<sup>-1</sup>) nos tempo  $t$  (d) e  $t_0$  (d) inicial.

#### 4.5 Composição Bioquímica da biomassa

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005) com fator de conversão de 5,22 para microalgas (ANDRADE *et al.*, 2019). Os lipídios totais foram extraídos e quantificados pelo método de Folch *et al.* (1957) com solução de clorofórmio-metanol (2:1). Foi utilizado método termogravimétrico para determinação de cinzas e umidade com temperaturas entre 25 e 900°C, proposto por Jesus *et al.* (2018). Os carboidratos foram determinados pela diferença percentual das quantidades de proteínas, lipídios, cinzas e umidade (ANDRADE *et al.*, 2019).

#### 4.6 Composição de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos foi obtida por transmetilação com trifluoreto de boro hexano e identificada por Cromatografia gasosa (CG-FID Clarus 680; Perkin Elmer). Os esteres metílicos de ácidos graxos foram separados com a coluna (DB-FFAP 30m x 0,32 mm x 0,25 mm) e com detector de ionização por chama. A temperatura do injetor foi 250 °C e o detector apresentou temperatura de 280 °C. A programação da temperatura foi 150 °C por 16 minutos, aumentando 2 °C min<sup>-1</sup> para 180 °C, mantida por 25 minutos, posteriormente foi para 210 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>, por mais 25 minutos. As injeções foram realizadas no volume de 1 µL, em duplicata. Os esteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através dos tempos de retenção obtido do cromatograma padrão (C4 – C24, 18, 919-AMP, sigma-Aldrich). As áreas de pico foram determinadas utilizando software Clarus Chromatography para normalização do

percentual das áreas de ácidos graxos totais, segundo método proposto por Cardoso *et al.* (2020).

#### 4.7 Avaliação das propriedades de biodiesel

As propriedades mais importantes para biocombustível foram avaliadas com as biomassas. Os parâmetros analisados foram: valor de iodo (VI), valor de saponificação (VS), número de cetanos (NC), fator de saturação de cadeia longa (FSCL), grau de insaturação (GI) e ponto de entupimento do filtro a frio (PEFF). Esses parâmetros foram calculados a partir de equações empíricas relatadas por Cardoso *et al.* (2020), partindo do perfil de ácidos graxos encontrado. Os cálculos de VS e VI foram baseados nos valores de VS e VI dos óleos vegetais de soja, palma e amendoim.

$$VI = \Sigma(254 \times D \times N) / M \quad (\text{Eq.2})$$

$$VS = \Sigma(560 \times N) / M \quad (\text{Eq.3})$$

$$NC = 46,3 + (5,458 / SV) - (0,225 \times IV) \quad (\text{Eq.4})$$

$$FSCL = (0,1 \times C16) + (0,5 \times C18) + (1 + C20) + (1,5 \times C22) + (2 \times C24) \quad (\text{Eq.5})$$

$$GI = MUFA + (2 \times PUFA) \quad (\text{Eq.6})$$

$$PEFF = (3,1417 \times FSCL) - 16,477 \quad (\text{Eq.7})$$

D é o número de ligações duplas, M é a massa molecular do ácido graxo e N é a percentagem de cada ácido graxo presente no óleo.

#### 4.8 Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais

A análise dos teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides seguiu método proposto por Andrade *et al.* (2019) com 0,2 g de amostra liofilizada adicionado 25 mL de acetona a 80%, agitada em vórtice (Phoenix AP 56) e centrifugada (Eppendorf 5702R) a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente e realizado a leitura de absorvância utilizando espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV-VIS) com comprimentos de onda de 663, 647 e 470 nm. Os rendimentos foram calculados seguindo as equações propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001) expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

$$C_a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647} \quad (\text{Eq.8})$$

$$C_b = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{663} \quad (\text{Eq.9})$$

$$C_{CT} = [1000 A_{470} - (1,82 C_a - 85,02 C_b)] / 198 \quad (\text{Eq.10})$$

$C_a$  = Clorofila *a*;  $C_b$  = Clorofila *b*;  $C_{CT}$  = Carotenoides totais

#### **4.9 Conversão teórica de carboidratos da biomassa de microalgas em etanol**

A conversão da concentração obtida de carboidrato na biomassa da *Chlorella vulgaris* utilizou cálculo baseado em 100 g de biomassa, constante teórica 0,511, eficiência de 70% da formação de etanol e conversão estequiométrica de glicose em etanol, proposto por Duarte *et al.* (2019).

#### **4.10 Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica (TGA - PerkinElmer, Pyris 1 TGA) foi realizada com temperatura variando de 25 °C a 900 °C sob atmosfera inerte e ar sintético com fluxo de 35 mL min<sup>-1</sup>. As amostras (5 mg) foram colocadas em bandeja de platina aquecida a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> para estudar o comportamento da pirólise da biomassa (JESUS *et al.*, 2018). Foi determinada a temperatura inicial de decomposição (Ti), a temperatura final (Tf) e a temperatura máxima de decomposição (Tdecomp).

#### **4.11 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

As amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (Spectrum two FT-IR Spectrometer – PerkinElmer) com transformada de Fourier e número de onda entre 4000 cm<sup>-1</sup> e 600 cm<sup>-1</sup>, segundo Campos *et al.* (2014).

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados foram analisados pelo software Statistica 10.0, utilizando análise de variância (ANOVA) para verificar a significância, seguida de teste de Tukey, a 95% de nível de confiança, para comparação das médias. Os resultados experimentais são apresentados como média ± desvio padrão, de triplicatas. O tratamento estatístico foi aplicado a todas as análises realizadas neste estudo.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Caracterização química da água produzida**

A água produzida (AP) geralmente possui pequenas quantidades de Nitrogênio (N) e Fósforo (P). No entanto, possui elementos que são importantes para crescimento de microalgas, como Ferro (Fe) (Tabela 6), que participa do transporte de elétrons e respiração celular, o Manganês (Mn), que atua como cofator em sistemas enzimáticos,

principalmente para manutenção da taxa fotossintética normal e o Zinco (Zn), que auxilia na captação de fósforo e na transcrição de DNA (AL-GHOUTI *et al.*, 2019; GRAHAM *et al.*, 2017; FOX; ZIMBA, 2018).

**Tabela 6** – Composição química da água produzida

Componente	Unidade	Resultado	LQ
Cloreto (Cl <sup>-</sup> )		3474,00	8,00
Sulfato (SO <sub>4</sub> )		33,10	-
Chumbo (Pb)		<0,05	-
Arsênio (As)		0,10	0,10
Cádmio (Cd)		<0,005	0,005
Níquel (Ni)		<0,02	0,02
Cobalto (Co)		<0,03	0,03
Cobre (Cu)		<0,05	0,05
Manganês (Mn)		0,90	-
Molibdênio (Mo)		<0,50	0,50
Vanádio (V)		<0,10	0,10
Selênio (Se)		<0,10	0,10
Titânio (Ti)		<0,10	0,10
Ferro (Fe)		0,10	-
Zinco (Zn)		<0,02	0,02
Cromo (Cr)		<0,05	0,05
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	mg L <sup>-1</sup>	382,00	-
Carbonato de sódio (H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )		< 2,00	2,00
Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)	µg L <sup>-1</sup>	778,78	-
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)	µg/L	40,04	-
pH (25°C)	-	7,30	-
Salinidade	‰	62,38	-
Óleos e Graxas totais	mg L <sup>-1</sup>	11,80	-
Sólidos totais dissolvidos (STD)	mg L <sup>-1</sup>	93,13	-

\*LQ = Limite de quantificação

A AP utilizada no estudo é composta majoritariamente por Cloreto (Cl<sup>-</sup>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e sulfato (SO<sub>4</sub>). Esses elementos associados aos metais e em determinadas concentrações são necessários para o crescimento de muitos microrganismos, incluindo as microalgas (ANSILAGO *et al.*, 2016). A AP apresentou, também, quantidade expressiva de hidrocarbonetos totais de petróleo, que poderia prejudicar o crescimento da microalga, no entanto, as microalgas procarióticas e eucarióticas tem a capacidade de oxidar vários metabólitos tóxicos, como hidrocarbonetos de petróleo (CERNIGLIA *et al.* 1980).

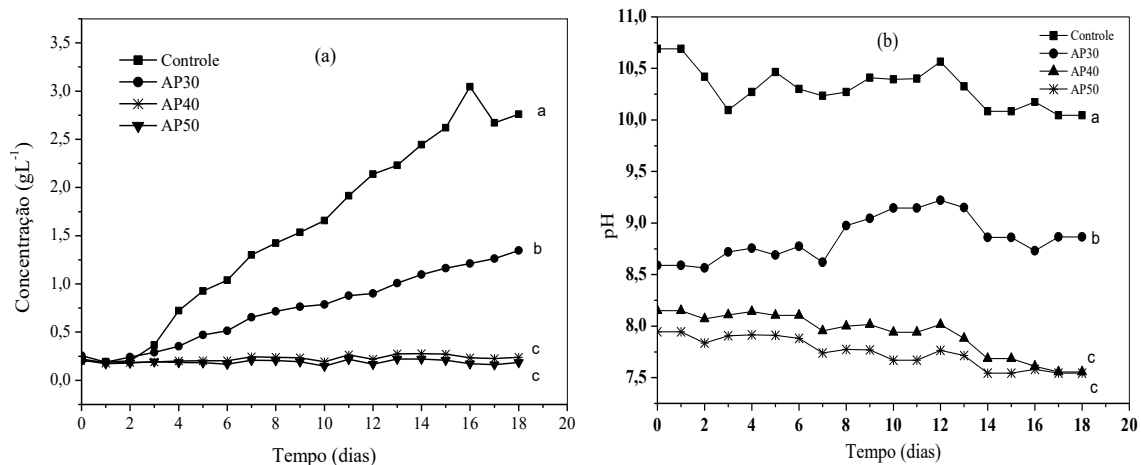
Além disso, alguns autores relatam que algumas microalgas, como *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella* sp, *Dunalliella tertiolecta* e *Scenedesmus* sp tem a capacidade de crescerem em ambientes adversos, ricos em sal, na presença de

contaminantes e em diferentes temperaturas produzindo biomassa e ácidos graxos (ARRIADA; ABREU, 2014; AL-GHOUTI *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2017).

## 5.2 Crescimento e pH

A curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de AP (30, 40 e 50%) é apresentada na Figura 8. Os tratamentos AP40% e AP50% não apresentaram crescimento microalgal ao longo do cultivo. Este comportamento pode estar relacionado ao rompimento da membrana celular causado pelo contato célula – AP, rica em contaminantes como metais, compostos orgânicos e nutrientes, que provocam interações entre os componentes tóxicos presentes em AP com organelas intracelulares da microalga, dificultando suas funções biológicas normais, incluindo o crescimento (KURADE *et al.*, 2016; AMMAR *et al.*, 2018). Autores como Ammar *et al.* (2018) também observaram inibição do crescimento de *Isocrysis galbana* com aumento da concentração de AP (10% para 50%). De maneira similar a este estudo, foi observado pelos autores uma sedimentação da microalga no fundo do fotobiorreator, que pode estar relacionada à presença de íons metálicos na cultura.

A curva de crescimento de *C. vulgaris* em AP30% apresentou crescimento, assim, como a curva do controle. Este comportamento ocorreu devido à capacidade das microalgas de degradarem constituintes tóxicos em produtos menos tóxicos (KURADE *et al.*, 2016). O período de adaptação foi observado em AP30% e controle com duração de dois dias (0 a 2ª dia) e crescimento exponencial até o sexto dia (Figura 8a). Segundo Cardoso *et al.* (2020) o crescimento após dois dias de cultivo retrata a boa capacidade de adaptação das microalgas as condições ambientais impostas. Assim, neste estudo a *C.vulgaris* apresentou boa adaptação à proporção de 30% AP. Semelhante aos resultados encontrados por Metha *et al.* (2018) no cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* em diferentes concentrações de sal, com fase de adaptação de dois dias e fase exponencial entre os dias 2 e 6.



**Figura 8** – Produção de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com diferentes proporções de AP (a) e pH (b). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os valores de pH inicial (dia 0) diminuíram com o aumento da concentração de AP nos tratamentos. Variando de 10,31 (controle) e 7,75 (AP50%) - Figura 8b. Nos tratamentos AP40% e AP50% a redução do pH associado à composição química de AP, pode ter limitado o crescimento. Segundo Gómez-Luna *et al.* (2021), essa redução costuma ser letal para as microalgas. Visto que, os limites de tolerância de pH são determinados pela influência da composição química do meio de cultivo ou efeitos metabólicos nas células (LAM *et al.*, 2017). Variações de pH (8,0 e 9,4) em diferentes salinidades também foram observadas por Church *et al.* (2017) no cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Nos tratamentos AP30% e no controle ocorreu o aumento e redução do pH ao longo dos dias de cultivo (Figura 8b), esse aumento do pH ocorreu devido ao consumo de CO<sub>2</sub> durante a fotossíntese (CHURCH *et al.*, 2017) e a liberação de hidróxido pela redução das moléculas de oxigênio produzidas (OTONDO *et al.*, 2018). No cultivo com *Nannochloropsis salina*, Otondo *et al.* (2018) observaram maiores taxas de crescimento no pH 8,0 e 9,0. Thirugnanasambantham *et al.* (2020) no cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio padrão encontraram melhor crescimento em condições alcalinas com pH 8,5. No presente estudo o pH acima de 8,0 (Controle e AP30%) apresentaram melhor crescimento e produção de biomassa, como relatado pelos autores. pH 8,0 é o indicado para maioria das espécies de água doce e pH 10,0 é descrito como ideal para *C. vulgaris* (GÓMEZ-LUNA *et al.*, 2021; GONG *et al.*, 2014). Portanto, uma faixa de pH entre 8 e 10 é ideal para cultura de *Chlorella*, como encontrado neste estudo.



O cultivo com água produzida (AP30%) apresentou produção máxima de 1,35 g L<sup>-1</sup> no 18<sup>a</sup> dia (Tabela 7). No cultivo controle, a produção máxima foi 3,05 g L<sup>-1</sup> no 16<sup>a</sup> dia. Valores inferiores encontrados no tratamento AP30% ocorrem devido ao estresse causado às microalgas pelos componentes contidos na AP, como a presença de hidrocarbonetos de petróleo, excesso de nutrientes e presença de metais (AMMAR *et al.*, 2018; ARRIADA; ABREU, 2014; MOTTA *et al.*, 2013). Mesmos com estas características a diluição de AP permitiu o crescimento da *C. vulgaris* devido à capacidade das microalgas em degradar hidrocarbonetos de petróleo em suas formas menos tóxicas, convertendo acetil-CoA em H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, possibilitando a produção de biomassa (HUO *et al.*, 2019).

Comportamento similar ao presente estudo foi observado por Zhai *et al.* (2017), onde a produção de biomassa de *Spirulina platensis* em águas residuais municipais (262,5 mg L<sup>-1</sup>) foi menor que o cultivo padrão (549,0 mg L<sup>-1</sup>). Church *et al.* (2017) em cultivo de *Chlorella vulgaris* em água residual salina também observaram redução da produção de biomassa com aumento do teor de água residual de 1,30 g L<sup>-1</sup> no cultivo padrão para 0,74 g L<sup>-1</sup>. Assim, as maiores produções de biomassa encontrada em meios de cultivo padrão comparada as águas residuais ocorrem devido à presença de contaminantes como metais, alguns nutrientes e outros compostos orgânicos no efluente (RAKHAMADUMILA; MUNTALIFI, 2020).

**Tabela 7** – Parâmetros de crescimento de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG-11 suplementado com diferentes concentrações de AP e controle.

Tratamentos	Produção final (g L <sup>-1</sup> )	Produção máxima (g L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	μ (d <sup>-1</sup> )	P/C
Controle	2,76±0,17 <sup>a</sup>	3,05±0,37 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,34±0,01 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>
AP30%	1,35±0,16 <sup>b</sup>	1,35±0,16 <sup>b</sup>	0,04±0,01 <sup>b</sup>	0,20±0,02 <sup>b</sup>	0,58 <sup>b</sup>
AP40%	0,24±0,01 <sup>c</sup>	0,28±0,002 <sup>c</sup>	0	-	-
AP50%	0,19±0,002 <sup>c</sup>	0,22±0,003 <sup>c</sup>	0	-	-

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ )

A taxa de crescimento específica (μ) do cultivo controle foi maior que o tratamento AP30% (Tabela 7). Este resultado pode estar relacionado à limitação de fósforo (P) na AP, visto que, o P atua como transportador de substratos ou energia química e sua presença aumenta o crescimento de algumas espécies de microalgas,

incluindo *Chlorella vulgaris* (BAUMGARTNER *et al.*, 2013). Além disso, baixas taxas de  $\mu$  são encontradas com o aumento da concentração de sal no meio (CHURCH *et al.*, 2017). Segundo Mehta *et al.* (2018) e Matos *et al.* (2018) concentrações moderadas de NaCl (até 1%), os íons de sódio podem ajudar na absorção de nutrientes e na regulação intracelular na fotossíntese. No entanto, as microalgas não toleram muito bem altas salinidades (2 – 6% de NaCl) o que pode causar estresse osmótico que interfere no processo de transporte de elétrons ou fotofosforilação da fotossíntese, provocando a redução no crescimento da microalga, possivelmente pela aquisição de espécies reativas de oxigênio.

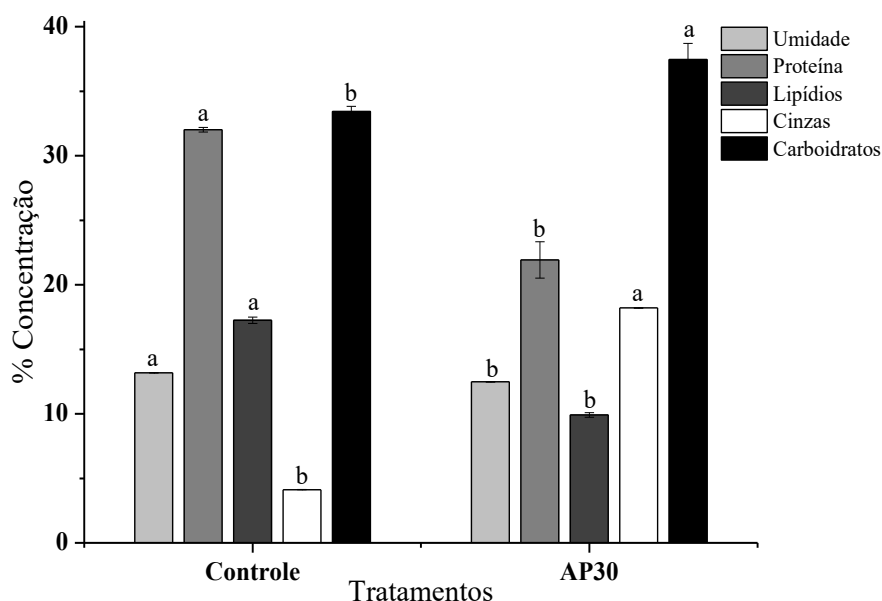
Comportamento similar a este estudo foi relatado por Ammar *et al.* (2018) no cultivo de *Nanochloropsis oculata* com 25% de AP (0,1796 d<sup>-1</sup>) e por Zhai *et al.* (2017) no cultivo de *Spirulina platensis* em água residual municipal, que apresentaram 0,279 d<sup>-1</sup> no meio Zarrouk e 0,212 d<sup>-1</sup> em água residual. Assim, maior taxa de crescimento ocorre para tratamentos com maiores concentrações de biomassa (CHURCH *et al.*, 2017).

### 5.3 Composição bioquímica da biomassa

A composição bioquímica da biomassa obtida do tratamento AP30% e controle estão demonstrados na Figura 9. A concentração de lipídios no tratamento AP30% (9,92%) foi menor que no controle (17,25%). Este resultado pode estar relacionado a alta salinidade da AP e ao estresse metálico forçando a degradação de macromoléculas para manutenção do metabolismo (CHURCH *et al.*, 2017; ARIF *et al.*, 2019). Além disso, a alta concentração de matéria orgânica presente em AP provoca uma condição de estresse adicional à microalga, que pode inibir a síntese de lipídios (LU *et al.* 2019; CARDOSO *et al.* 2020).

Neste estudo a salinidade de AP juntamente com os sais presentes no meio sintético BG-11, pode ter sido superior ao tolerado pela *C. vulgaris*, provocando a redução de lipídios. Jawaharraj *et al.* (2016) também encontraram baixa concentração de lipídios em cultivo de *Oscillatoria* sp. 50A em água residual da agroindústria (9,6%), no entanto, Gao *et al.* (2018) relataram alta quantidade de lipídio em cultivo de *Chlorella* sp em água residual sem tratamento (29%). Essa variação dos teores de lipídios encontradas nos estudos sugere que a presença de produtos químicos interfere nas concentrações dos lipídios (KUMAR *et al.*, 2017).

O teor de proteína no tratamento AP30% (21,94%) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao tratamento controle (32,03%). O menor teor de proteína na AP está relacionado ao estresse salino, onde células submetidas a altas salinidades redirecionam a energia disponível para a osmorregulação, em detrimento da síntese proteica (MATOS *et al.*, 2018). Além disso, o estresse causado pela limitação de N pode diminuir a síntese de proteínas e aumentar o metabolismo de carboidratos e cinzas (CARDOSO *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2017). Resultados similares ao presente estudo foram relatados por MATOS *et al.* (2018) em *Chlorella vulgaris* cultivada em meio salino, com 20% de teor de proteína e 37,2% no controle. Assim, grande quantidade de energia é utilizada para retirada de íons de sódio da célula, o que limita a síntese de proteínas (ZHOU *et al.*, 2017).



**Figura 9** – Composição bioquímica da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle. Letras iguais no mesmo parâmetro de composição bioquímica indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

A umidade apresentou concentração de 12,48% no tratamento AP30% e 13,18%, no controle. Esses valores são considerados usuais segundo Matos *et al.* (2018), que encontraram 18,8% de umidade, no cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio salino, parâmetro ainda considerado intermediário, segundo os autores. O conteúdo de cinzas foi maior no tratamento AP30% (18,21%) do que encontrado no controle (4,12%). Possivelmente, devido ao excesso de sais encontrados na AP, como carbonato de cálcio, sódio e cloretos, e ao acúmulo de metais alcalinos nas células das microalgas (MATOS *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2015), dificultando a degradação durante a pirólise de biomassa (GAI *et al.*, 2018). Matos *et al.* (2018) no

cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio salino encontraram 32,7% de cinzas, valores maiores ao encontrado nesse estudo, provavelmente pela concentração e diferenças de sais minerais no meio. Xu *et al.* (2019) em cultivo com *Chlorella* em água residual de esgoto encontraram teor de cinzas semelhante ao observado (16,06%).

As concentrações elevadas de carboidratos no tratamento AP30% (37,55%) e controle (33,42%) podem estar relacionadas ao fotoperíodo contínuo (24h) empregado, que proporciona a formação de amido e açúcares pela via de redução da pentose de fosfato (JACOB-LOPES *et al.*, 2009). Outro fator para maior concentração de carboidratos no cultivo com AP é o estresse causado pela salinidade do meio, que induz a microalga a armazenar energia como proteção celular e como componente estrutural (DUARTE *et al.*, 2019). Altos valores de carboidratos também foram encontrados por Mata *et al.* (2020) em cultivo de *Spirulina* sp LEB18 em água residual salina (42,29%). A quantidade expressiva de carboidratos neste estudo apresenta uma importante fonte biotecnológica de bioetanol, visto que microalgas produzem carboidratos fermentados isentos de lignina (ANDRADE *et al.*, 2019).

A relação proteína/carboidrato (P/C) no tratamento AP foi menor que o controle (Tabela 7). Essa relação é um parâmetro utilizado para demonstrar a deficiência celular. Valores da taxa proteína/carboidratos  $<0,7$  reflete alta deficiência de nutrientes, entre  $0,7 - 1,2$  deficiência intermediária e  $>1,2$  pouca ou nenhuma deficiência de nutrientes (GANF *et al.*, 1986). Os baixos valores encontrados neste estudo ocorreram devido ao estresse causado pela associação da composição da AP com a luminosidade contínua, que provoca o aumento dos teores de carboidratos na célula, modificando a relação (DUARTE *et al.*, 2019; JACOB-LOPES *et al.*, 2009). Zhou *et al.* (2017), relataram redução da taxa P/C em *Spirulina platensis* com aumento da água residual rica em sais.

#### 5.4 Composição de ácidos graxos

As concentrações de ácidos graxos no tratamento AP e controle são apresentados na Tabela 8. No tratamento AP30% foi encontrados 66,41% de ácidos graxos saturados (AGS), 7,26% de monoinsaturados (AGM) e 13,09% de polinsaturados (AGP). O controle apresentou 54,14; 10,34 e 21,50% para AGS, AGM e AGP, respectivamente. A maior composição de ácidos graxos saturados encontrados nesse estudo ocorre devido ao fotoperíodo contínuo, onde acontecem maiores produções

de ATP e NADPH que auxiliam na distribuição do excesso de energia luminosa e previne dano celular (KHOEYI *et al.*, 2012).

A maior concentração de ácidos graxos saturados no tratamento AP30% e menor concentração de AGP em relação ao controle está relacionado a alta salinidade do meio (CHURCH *et al.*, 2017). Segundo Cardoso *et al.* (2020) grandes quantidades de sais estimulam a síntese da enzima dessaturase, que auxilia na produção dos ácidos graxos saturados. Church *et al.* (2017) também observaram diferença dos teores de AGS em *Chlorella vulgaris* cultivada no meio com alta salinidade e no controle de 16,99 para 21,53%. Zhang *et al.* (2018) no cultivo de *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 em água residual de efluentes de cozinhas em várias diluições, apresentaram valores similares de saturados e polinsaturados encontrados neste estudo (56,76% e 13,03%, respectivamente). O grau de saturação encontrado é favorável para a obtenção de biodiesel de qualidade, visto que maiores quantidades de AGS aumentam a qualidade de ignição, e menor percentual de AGP evita a auto-oxidação (REZASOLTANI *et al.*, 2019; ANTO *et al.*, 2019; SHANMUGAM *et al.*, 2020; SANDANI *et al.*, 2020).

**Tabela 8** – Composição de ácidos graxos da biomassa de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.

Ácido graxo	Tratamento %		
	Nome comum	Controle	AP30%
C4:0	Ácido butírico	1,29±0,88	2,02±1,68
C10:0	Ácido cáprico	-	0,05±0,01
C11:0	Ácido hendecanóico	0,24±0,05	0,32±0,00
C12:0	Ácido láurico	-	0,09±0,02
C13:0	Ácido tridecílico	3,16±0,04	1,83±0,10
C14:0	Ácido mirístico	0,17±0,06	0,35±0,01
C14:1 $\omega$ 5	Ácido miristoléico	0,85±0,07	0,44±0,05
C15:0	Ácido pentadecílico	0,52±0,02	0,27±0,15
C15:1	Ácido pentadecenóico	1,20±0,04	0,56±0,10
C16:0	Ácido palmítico	12,50±0,82	17,12±0,47
C16:1 $\omega$ 7	Ácido palmitoléico	1,05±0,14	1,47±0,08
C18:0	Ácido esteárico	16,65±1,23	12,15±0,40
C18:1t	Ácido elaídico	2,96±0,04	5,93±0,01
C18:1c	Ácido oléico	1,20±0,06	1,96±0,05
C18:3n6	Ácido $\gamma$ -linolênico	13,09±0,38	21,50±0,18
C20:0	Ácido araquídico	31,90±1,14	19,96±0,04
Saturados		66,41±1,92 <sup>a</sup>	54,14±0,64 <sup>b</sup>
Monoinsaturados		7,26±0,16 <sup>b</sup>	10,34±0,07 <sup>a</sup>

Poli-insaturados	13,09±0,38 <sup>b</sup>	21,5±0,18 <sup>a</sup>
Não determinado	13,24±1,70	14,02±0,53
Total	100	100

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

O tratamento com AP30% apresentou como AG majoritários C18:3n6, C20:0, C16:0 e C18:0. Grandes concentrações da família C16 e C18 encontrados ocorrem devido à ação da acetil-CoA carboxilase, que converte o carbono presente no meio, por alongamento e dessaturação em malonil-CoA, que forma principalmente as cadeias de carbono C16 e C18 (CARDOSO *et al.*, 2020). Diferentes autores também observaram a prevalência desses ácidos graxos em seus estudos, como: Anto *et al.* (2019) em cultivo de *Chlorella* sp, em meio com privação de nitrogênio, encontraram majoritariamente ácidos graxos C16:0 (23,8%), C18:1 (22,71%) e C18:3 (12,19%). GAO *et al.* (2019) no cultivo de *Chlorella vulgaris* em efluentes secundários apresentou predominância de ácido graxo C16:0 (33,17%), C18:0 (19,63%) e C18:1 (18,12%). Ge *et al.* (2018), no cultivo de *Chlorella vulgaris* em cultivo mixotrófico, encontraram prevalentemente ácidos graxos C16 e C18, apresentando C16:0 (26,2%), C18:1 (19,9%), C18:2 (11,9%) e C20:0 (6,3%).

Diferentemente do tratamento AP30%, o controle apresentou como AG majoritário C20:0, possivelmente pela cultura ser composta apenas por BG-11, que possui maior concentração de nitrato (NO<sub>3</sub>) que AP30%. Segundo Costa *et al.* (2006) o aumento da concentração de NO<sub>3</sub>, aumenta o teor de C20:0. Estes autores relatam que no cultivo de *Chlorella minutissima*, em meio BG-11 o teor de C20:0 foi de 22,62%.

A diversidade e perfil de ácidos graxos encontrados no tratamento AP30% reforça a possibilidade de obtenção de biodiesel de qualidade a partir da biomassa produzida. Visto que, altas concentrações de C16:0 e C18:3 são alguns dos principais ácidos graxos envolvidos na melhora das propriedades do biodiesel (CHI *et al.*, 2021).

## 5.5 Avaliação das propriedades de biodiesel

Na Tabela 9 são apresentados os índices de qualidade do biodiesel teórico, utilizando a biomassa do tratamento como substrato. O valor de iodo (VI), que indica o grau de insaturação dos ácidos graxos, refere que quanto maior a quantidade de insaturações maior o depósito e deterioração do óleo lubrificante. No presente estudo, o

valor de iodo (VI) foi adequado para os padrões nacional e europeu ( $<120\text{g I}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), onde o tratamento apresentou valor  $68,48\text{g I}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}$  devido ao alto percentual de ácidos graxos saturados (54,14%) em relação aos ácidos graxos insaturados. Resultados dentro do limite preconizado de VI também foram encontrados por Cardoso *et al.* (2020) no cultivo de *Spirulina* sp LEB18 em proporções diferentes de água residual de aquicultura ( $87,78 - 103 \text{ gI}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e Jawaharraj *et al.* (2016) no cultivo de *Oscillatoria* sp ( $65,6 \text{ g I}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e *Synechocystis* sp ( $50,5 \text{ g I}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em água residual industrial.

O índice do valor de saponificação (VS) indica a quantidade necessária para saponificar 1 g de óleo. A reação de saponificação interfere na reação de transesterificação da produção de biodiesel, portanto, baixos teores de saponificação melhora a qualidade de biodiesel. Apesar de não haver parâmetros padronizados de VS, esses valores são comparados com biodiesel de óleo vegetal, como óleo de palma (192-202); óleo de soja (189-195) e óleo de girassol (188-194) (KRISNANGKURA, 1986; NASCIMENTO *et al.*, 2013; ARIF *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2020). Neste estudo, o tratamento com AP30% apresentou valores próximos a dessas fontes vegetais (182,07). O VS é determinado pelo peso molecular médio, quanto maior VS, menor é a massa molar dos triglicerídeos (ROCKEMBACH *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi encontrado por Jawaharraj *et al.* (2016) no cultivo de *Synechocystis* sp (193,4), *Oscillatoria* sp (202,8) e *Jatropha* sp (199,7) em água residual industrial.

O número de cetanos (NC) define a qualidade de ignição do combustível, a faixa de NC indicada pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) varia de 40-50. As normas americanas exigem mínimo de 47 e as normas europeias, mínimo de 51 (CARDOSO *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2013). No presente estudo o NC apresentou valor (60,85) recomendado pelos padrões internacionais  $\geq 51$  UE e  $\geq 47$  EUA. Estes resultados estão relacionados a maior concentração de ácidos graxos saturados. Valores alto de cetanos promovem um bom desempenho do motor e diminui a formação de fumaça, sendo o parâmetro utilizado para avaliar a qualidade de combustão e do tempo de atraso de ignição (ZHANG *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram encontrados por Jawaharraj *et al.* (2016) em cultivo de *Synechocystis* sp e *Oscillatoria* sp em águas residuais industriais, NC (58,5 e 63,2 respectivamente) e Zhang *et al.* (2018) no cultivo de *Chlorella sorokiniana* em água residual da cozinha, NC (59,24).

**Tabela 9** – Propriedade de biodiesel dos ácidos graxos obtidos da biomassa de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.

Propriedade de biodiesel	Tratamento	
	Controle	AP30%
Valor de iodo (VI) (g I <sub>2</sub> 100g <sup>-1</sup> )	42,77	68,48
Valor de saponificação (VS)	177,69	182,07
Número de cetanos (NC)	67,36	60,84
Fator de saturação de cadeia longa (FSCL) (wt.%)	41,48	27,75
Grau de insaturação (GI) (wt.%)	33,44	53,34
Ponto de entupimento do filtro frio (PEFF) (°C)	113,83	70,7

O fator de saturação de cadeia longa (FSCL) determina o comportamento do biodiesel em baixas temperaturas. Representa as percentagens em peso dos ácidos graxos saturados de cadeia longa (C16; C18; C20; C22 e C24) (NASCIMENTO *et al.*, 2013; MONDAL *et al.*, 2019). O tratamento desse estudo apresentou valor maior (27,75%) indicado para qualidade de biodiesel, diferente do que foi relatado por Nascimento *et al.* (2013) para *Chlorella vulgaris* em meio padrão (1,57%) e ao encontrado por Cardoso *et al.* (2020) no cultivo da *Spirulina* sp LEB18 em água residual de aquicultura (4,81 a 5,52%). Altos valores de FSCL diminuem as propriedades de biocombustível. Visto que as moléculas saturadas tendem a cristalizar em temperaturas de operação do motor, logo, quando a temperatura é reduzida os cristais se aglomeram rapidamente causando obstrução dos filtros e das linhas de combustível (MONDAL *et al.*, 2019).

O Grau de insaturação (GI) está relacionado a quantidade de ligações duplas e ao valor de iodo, descrevendo a estabilidade a oxidação do biodiesel (JAWAHARRAJ *et al.*, 2016; WU; MIAO, 2014). Os valores de GI deste estudo foi 53,34%, proporcional ao valor de iodo. No entanto, foram menores aos valores encontrado por Cardoso *et al.* (2020) nos tratamentos da *Spirulina* sp. LEB18 em diferentes proporções de água residual (74,54% - 86,83%). GI é medido com base nas massas de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, logo, quanto mais insaturações presente, maior será o GI e o VI (RAMOS *et al.*, 2009). Portanto, menor grau de insaturação é ideal, principalmente de ácidos graxos polinsaturados, de cadeia longa, como ácido linoleico e linolênico que são mais susceptíveis a oxidação do que os monoinsaturados, devido à posição bis-alílica em C11 no ácido linoléico e em C11 e C14 no ácido linolênico (RAMOS *et al.*, 2009; WU; MIAO, 2014; SHEKH *et al.*, 2015).



O ponto de entupimento do filtro frio (PEFF) é um índice usado para observar desempenho do biodiesel em baixas temperaturas e está relacionado ao conteúdo de ácidos graxos saturados, pois esses ácidos graxos em baixas temperaturas cristalizam e causam precipitação entupindo filtros, bombas, injetores e tubulações que podem causar mudança na viscosidade e terem propriedades fracas de fluxo a frio (NASCIMENTO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2018; YAŞAR, 2020; SHANMUGAN *et al.*, 2020). A ANP considera máximo de 19 °C para esse parâmetro, no respectivo estudo o valor excedeu em quase quatro vezes (70,70 °C) o valor recomendado. Esse alto índice indica baixa indução a baixa temperatura (ZHANG *et al.*, 2018). No entanto, aditivos podem ser usados para inibir a aglomeração de cristais (ARIF *et al.*, 2019; CHURCH *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2013). Cardoso *et al.* (2020) apresentaram PEFF (-1,36 a 0,86 °C) em diferentes proporções de água residual da aquicultura no cultivo de *Spirulina* LEB18 e Jawaharraj *et al.* (2016) PEFF (-8,1 a 3,1 °C) em cultivo de *Oscillatoria* sp, *Synechocystis* sp e *Jatropha* sp em águas residuais industriais.

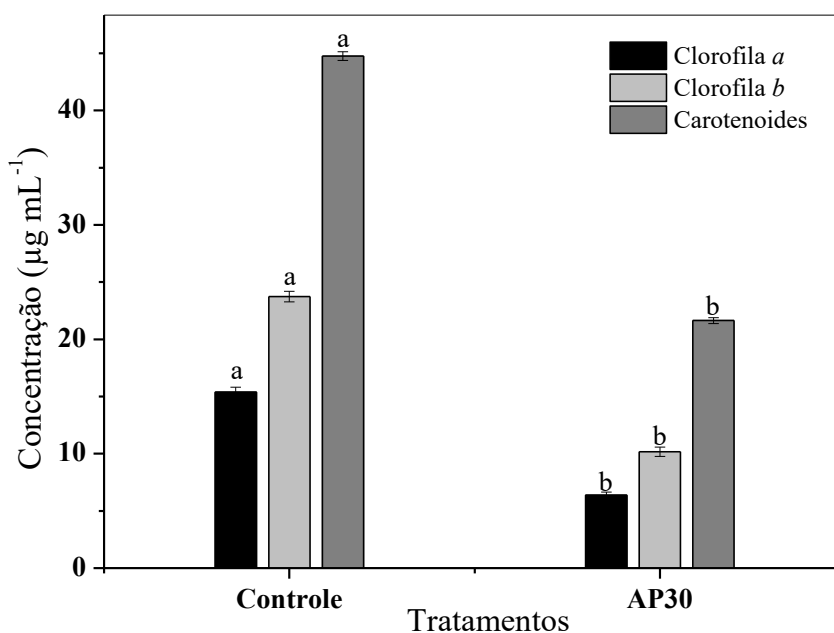
Diversos fatores interferem nas propriedades do biodiesel. A qualidade do biodiesel está relacionada a estabilidade oxidativa, que depende da presença de peróxidos, luz, ar, calor, metais traços dos compostos (RAMOS *et al.*, 2009). Além disso, a qualidade do biodiesel também é afetada pela presença de clorofila. Altas concentrações de clorofila, como encontrado nesse estudo, resultam em biodiesel de baixa qualidade, com menor estabilidade oxidativa. Portanto, a remoção pode ser interessante, com adição de métodos físicos e-ou químicos (SUASTES-RIVAS *et al.*, 2020). Contudo, as propriedades de biodiesel avaliadas sugere potencialidade no uso de biodiesel obtido da biomassa de *Chlorella vulgaris*.

## 5.6 Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais

Os valores de clorofila *a*, *b* no tratamento AP30% e controle foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) – Figura 10. Ambos os tratamentos apresentaram teores relevantes de pigmentos, que podem ser relacionados a alta produção de biomassa. Visto que altas concentrações de biomassa resultam em alta concentração de pigmentos (GE *et al.*, 2018). Este fato ocorre devido às condições de cultivo, como a incidência de luz contínua utilizado nesse estudo. A luminosidade afeta a quantidade e a qualidade de energia utilizada para as atividades metabólicas dos organismos

fotossintéticos. Além de estimular o crescimento e ao acúmulo de biocompostos como, por exemplo, pigmentos (BENAVENTE-VALDES *et al.*, 2016).

O tratamento AP30% apresentou 6,64 e 10,57  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila *a* e clorofila *b* respectivamente. Para o controle esses valores foram 15,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (clorofila *a*) e 24,21  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (clorofila *b*). Os menores valores encontrados no tratamento AP30%, em relação ao controle, ocorrem devido às condições de estresse submetidas à microalga em AP, pela presença de hidrocarbonetos, metais e excesso de matéria inorgânica (AMMAR *et al.*, 2018). Pois, segundo Yun *et al.* (2019) sob estresse, microalgas sofrem degradação e redução de pigmentos como clorofila. Gao *et al.* (2018) em cultivo de *Chlorella* sp em água residual de frutos do mar encontraram teor de clorofila total de aproximadamente 18  $\text{mg L}^{-1}$  durante 20 dias, semelhante ao presente estudo (17,21  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Markou *et al.* (2012) no cultivo de *Arthrospira platensis* em diferentes concentrações de fósforo e com aumento da intensidade de luz apresentaram produção de clorofila total variando entre 23,74 e 58,39  $\text{mg L}^{-1}$ , intervalo que contempla o valor observado no controle, neste estudo (40,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura 10** – Concentração de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle. Letras iguais no mesmo parâmetro indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os altos teores de carotenoides no tratamento AP30% (21,38  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e no controle (44,37  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) encontrados no estudo ocorrem devido à exposição dos cultivos, sob luz contínua, como resposta antioxidante para inibir a formação de

peróxidos e oxigênio reativo. Visto que os carotenoides estão presentes na membrana do cloroplasto e tem a função de proteger os sistemas fotossintéticos contra a tensão da iluminação (YUSOF *et al.*, 2021). Ge *et al.* (2018) no cultivo de *Chlorella vulgaris* em água residual municipal, obtiveram  $12,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides, menor ao que foi apresentado neste estudo ( $21,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Assim, as concentrações elevadas de carotenoides neste estudo, estão relacionadas a associação de alta luminosidade e a presença de poluentes na AP. Visto que os carotenoides são biomarcadores sensíveis a poluentes em meio aquoso, quanto maior seu valor, maior é a poluição presente no meio de cultura (CARDOSO *et al.*, 2020).

### 5.7 Conversão teórica de carboidratos da biomassa de microalgas em etanol

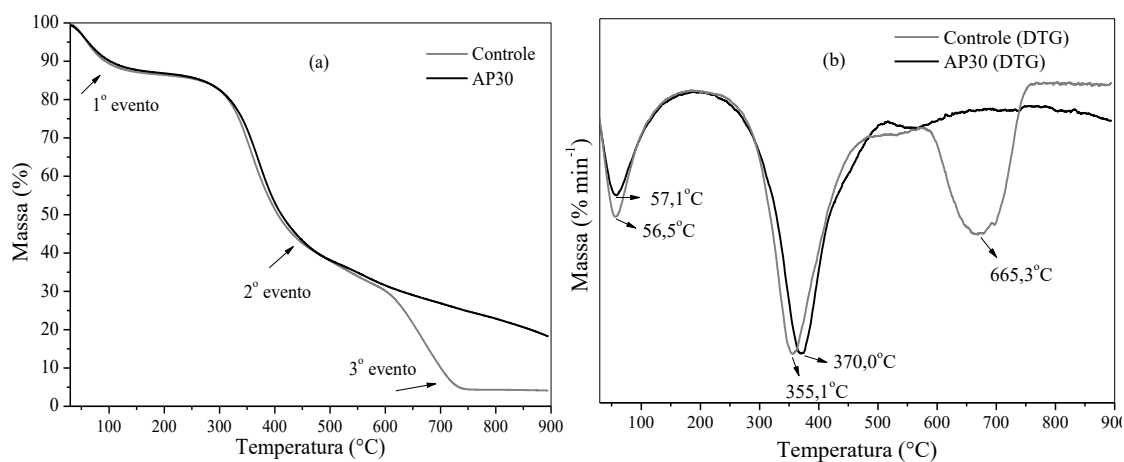
A produção teórica de etanol a partir dos carboidratos da biomassa de *C. vulgaris* no tratamento AP30% foi  $17,02 \text{ mL } 100\text{g}^{-1}$  e  $15,15 \text{ mL } 100\text{g}^{-1}$  no controle. Esses valores expressivos de etanol teórico representam uma alternativa para a produção de biocombustíveis, porque as biomassas de microalgas possuem alto teor de carboidratos em termos de amido e celulose, que são excelentes para a produção de bioetanol, principalmente pela ausência de lignina e por não conter células recalcitrantes, que converte mais facilmente os açúcares em etanol, diminuindo o custo de processamento e pré-tratamento (FREITAS *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2019).

Duarte *et al.* (2019) no cultivo de *Spirulina* sp LEB18 em águas subterrâneas salobras encontraram  $25,84 \text{ mL } 100\text{g}^{-1}$  do valor teórico de etanol. Rosa *et al.* (2015) no cultivo de *Spirulina* sp. LEB18 com monoetanolamina (MEA) encontraram valor teórico de etanol de  $12,8 \text{ mL } 100\text{g}^{-1}$ . Neste estudo o valor de etanol teórico foi superior ao encontrado por Rosa *et al.* (2015) e inferior aos estudos de Duarte *et al.* (2019). Assim, os resultados encontrados apresentam biomassa com potencial para uso na produção de bioetanol.

### 5.8 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada pelas curvas TG e DTG. A curva do controle apresentou três eventos e a curva do tratamento com AP30% apresentou dois eventos (Figura 11). O primeiro evento apresentou faixa de temperatura  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , referente a retirada de água livre (ANDRADE *et al.* 2019; JESUS *et al.*, 2018), com perda de massa de 12,48% para o tratamento AP30% e 13,18% para o controle. O segundo evento ocorreu entre  $190$  e  $520 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo o principal estágio de pirólise, pois

representa a decomposição de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos, materiais voláteis e carbono (LIU *et al.*, 2015). O terceiro evento, apenas observado no controle, na faixa de 520 e 800 °C. Nesse estágio ocorre a decomposição de C-C e C-H (LIU *et al.*, 2015), referente à decomposição do carvão ou a resquícios de grupos funcionais como proteína, carboidrato e compostos inorgânicos, como cinzas (LI *et al.*, 2017; GAI *et al.* 2018).



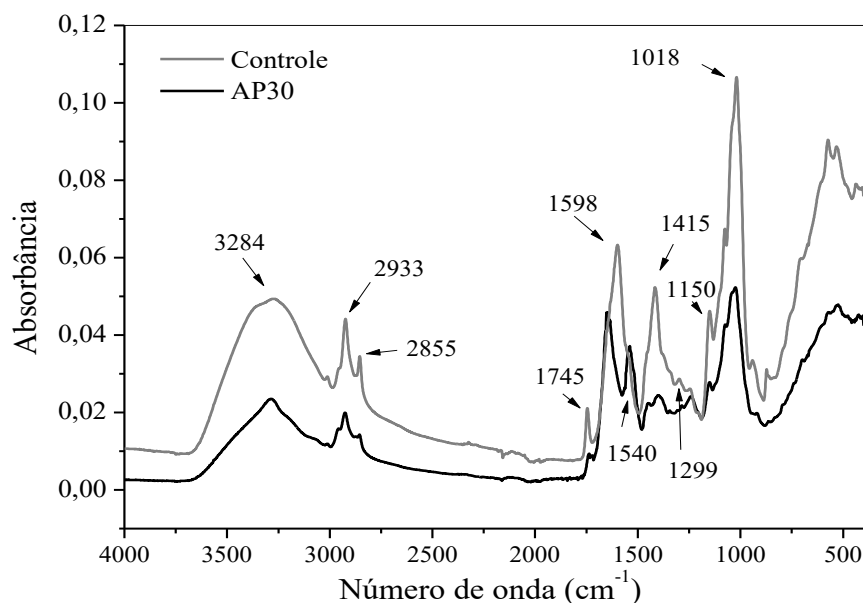
**Figura 11** – Análise termogravimétrica (a) e derivada termogravimétrica (b) da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle

Andrade *et al.* (2019) no cultivo de *Spirulina* sp LEB18 em meio Zarrouk reutilizado, apresentou três eventos de degradação, assim como neste estudo, o primeiro referente a perda de massa, até aproximadamente 190 °C. O segundo evento aconteceu em torno de 290 °C e o terceiro evento após 500 °C. Gai *et al.* (2018) em cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis* também encontraram 3 eventos térmicos. Primeiro evento entre 25 e 127 °C, o segundo entre 127 e 327 °C e o terceiro 427 – 727 °C. As temperaturas variaram a valores próximos ao apresentado neste estudo.

## 5.9 Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR do tratamento AP30% e controle (Figura 12) apresentaram diferenças na intensidade e formato em algumas bandas. Ambos apresentaram banda entre 3300 e 3275  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupamento OH (LI *et al.*, 2017), que representam resíduo de açúcar e água residual (ZHOU *et al.*, 2017). A banda 3275  $\text{cm}^{-1}$  representa ligações –N-H que indica a presença de amins II presentes em lipídios e proteínas

(ANDRADE *et al.*, 2019). Foi observado também banda entre 2934 e 2915  $\text{cm}^{-1}$  que representa alongamento das vibrações simétricas e assimétricas de cadeias saturadas de C-H (SUASTES-RIVAS *et al.*, 2020). Entre 2860 e 2847  $\text{cm}^{-1}$  também se refere aos grupos funcionais  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ , que formam o esqueleto lipídico.



**Figura 12** – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP e controle.

Nas bandas entre 1745 e 1410  $\text{cm}^{-1}$  ocorreu deslocamento no tratamento AP30%. Segundo Kumar *et al.* (2017) essa região representa éster metílico de óleo de algas, C=O. Além disso, Bataller e Capareda (2018) e Li *et al.* (2017) relatam que o intervalo entre 1774 e 1583  $\text{cm}^{-1}$  é referente à banda de amida I, nas vibrações de alongamento C=O e a faixa 1583 e 1484  $\text{cm}^{-1}$  está relacionado à banda de amida II, que resulta na curvatura N-H e C-N, sugerindo a presença de ligação peptídica entre duas moléculas de aminoácidos (GAI *et al.*, 2018), ambos os grupamentos foram observados. Entre 1426 e 1377  $\text{cm}^{-1}$  e 1329 e 1290  $\text{cm}^{-1}$  que representa cadeia lateral de proteína e amida III COO<sup>-</sup> (BATALLER; CAPAREDA, 2018; LI *et al.* 2017) também foi observado no espectro. Os tratamentos apresentaram ainda banda intensa entre 1031 e 1014  $\text{cm}^{-1}$ , que segundo Bataller e Capareda (2018) e Andrade *et al.* (2019) é a região referente ao alongamento de C-O e C-C, característico de carboidratos.

Li *et al.* (2017) em cultivo de *Tetraselmis suecica* em diferentes concentrações de  $\text{CO}_2$  apresentaram picos semelhantes ao encontrado nesse estudo, 3402  $\text{cm}^{-1}$

(referente à ligação OH), 3325  $\text{cm}^{-1}$  (ligações N-H), 2998-2854  $\text{cm}^{-1}$  (C-H) de lipídios, 1734  $\text{cm}^{-1}$  (C=O dos ésteres), 1583  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), 1521  $\text{cm}^{-1}$  - amida II (N-H e C-H) e 1423  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>) também relacionado às proteínas e 1059  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C de polissacarídeos). Bataller e Capareda (2018) em concordância aos demais autores também encontraram, em cultivo de *Spirulina platensis*, 3960-3340  $\text{cm}^{-1}$  (ligação OH), 2981-2767  $\text{cm}^{-1}$  (C-H) de lipídios, 1762-1719  $\text{cm}^{-1}$  (C=O dos ésteres), 1583-1484  $\text{cm}^{-1}$  (amida II), 1482-1456  $\text{cm}^{-1}$  (banda de absorção de CH<sub>2</sub>) de proteínas, 1426-1377  $\text{cm}^{-1}$  e 1329-1290  $\text{cm}^{-1}$  cadeia lateral de proteína e amida III, além de 1186-955  $\text{cm}^{-1}$  (referente a carboidratos).

## 6 CONCLUSÃO

A pré-adaptação do inóculo ao fotoperíodo contínuo estimulou a produção de biomassa no cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP. Dentre os tratamentos o único a apresentar viabilidade e alta produção de biomassa. Além disso, o estresse adicional do fotoperíodo de 24 horas atuou de forma sinérgica com a alta carga de estresse químico da AP, favorecendo a produção final de biomassa e a síntese de biomoléculas pela microalga. Portanto, a estratégia de cultivo combinando um estresse físico e químico, produziu biomassa com maior conteúdo de carboidratos (37,55%) e cinzas (18,21%) em relação ao controle, além de concentrações relevantes de proteínas e pigmentos como clorofila *a*, *b* e carotenoides.

O perfil de ácidos graxos da biomassa foi ideal para obtenção de biodiesel de qualidade, com 66,41% de ácidos graxos saturados, 7,26% de monoinsaturados e 13,09% de polinsaturados. Assim como potencial para produção de bioetanol, devido a seus altos teores de carboidratos. Aliando o efeito de fitorremediação da *Chlorella vulgaris* submetida ao tratamento AP30%, a produção de biomoléculas e bioprodutos de alto valor agregado.

## REFERÊNCIAS

- ADITIYA, H.; MAHLIA, T.; CHONG, W.; NUR, A.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66, 631–653, 2016.
- ALÉMAN-NAVA, G.; MUYLAERT, K.; BERMUDEZ, S. P.; DEPRAETERE, O.; RITTMANN, B.; PARRA-SALDÍVAR, R.; VANDAMME, D. Two-stage cultivation of *Nannochloropsis oculata* for lipid production using reversible alkaline flocculation. *Bioresource Technology* 226, 18–23, 2017.
- AL-GHOUTI, M.; AL-KAABI, M.; ASHFAQ, M.; ADEL DA'NA, D. Produced water characteristics, treatment and reuse: a review. *Journal of water process engineering* 28, p. 222–239, 2019.
- ALMOMANI, F.; JUDD, S.; BHOSALE, R.; SHURAIR, M.; ALJAML, K.; KHRAISHEH, M. Intergraded wastewater treatment and carbon bio-fixation from flue gases using *Spirulina platensis* and mixed algal culture. *Process Safety and Environmental Protection* 124, 240–250, 2019.
- AMMAR, S.; KHADIM, H.; Mohamed, A. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental technology & innovation*, 2018.
- ANDRADE, B.; CARDOSO, L.; ASSIS, D.; COSTA, J.A.; DRUZIAN, J.I.; LIMA, S. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. *Bioresource technology*, 2019.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. Cultivation of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* in bench scale using medium contaminated with heavy metals. *Eng. sanit ambient*, v.21 n.3, 603-608, jul/set 2016.
- ANTO, S.; PUGAZHENDHI, A.; MATHIMANI, T. Lipid enhancement through nutrient starvation in *Chlorella* sp. and its fatty acid profiling for appropriate bioenergy feedstock *Biocatalysis and agricultural biotechnology* 20, 101179, 2019.
- ARANSIOLA, E.; OJUMU, T.; OYEKOLA, O.; MADZIMBAMUTO, T.; IKHU-OMOREGBE, D. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass an bioenergy*, 1 e 22, 2013.
- ARAVANTINO, A.; THEODORAKOPOULOS, M.; MANARIOTIS, I. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids Production. *Bioresource Technology* 147, 130–134, 2013.
- ARIF, M.; BAI, Y.; USMAN, M.; JALALAH, M.; HARRAZ, F.; AL-ASSIRI, M.; LI, X.; SLAMA, E.; ZHANG, C. Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: role of lipidomics. *Bioresource technology*, 2019.

ARRIADA, A.; ABREU, P. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. Brazilian journal of petroleum and gas | v. 8 n. 3 | p. 119-125 | 2014.

ANP, 2000. Portaria nº 100/2000, de 20 de junho de 2000. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Brasil.

ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Brasil. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br>. Acessado em Ago, 2021.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Washington: AOAC.

ATIA, F.; AL-GHOUTI, M.; AL-NAIMI, F.; ABU-DIEYEH, M.; AHMED, T.; AL-MEER, S. Removal of toxic pollutants from produced water by phytoremediation: Applications and mechanistic study. Journal of Water Process Engineering 32, 100990, 2019.

BAGHERI, M., ROSHANDEL, R.; SHAYEGAN, J. Optimal selection of an integrated produced water treatment system in the upstream of oil industry. Process Safety and Environmental Protection, 117, 67–81, 2018.

BATALLER, B.; CAPAREDA, S. A rapid and non-destructive method for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transform infrared – attenuated total reflectance spectroscopy. Algal research 32, 341–352, 2018.

BAUMGARTD, F.; ZANDON'A FILHO, A.; BRANDALIZE, M.; COSTA, D. ANTONIOSI FILHO, N.; ABREU, P.; CORAZZA, M.; RAMOS, L. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. The Journal of Supercritical Fluids, 2015.

BAUMGARTNER, T.; BURAK, J. A.; KOGIKOSKI, M.; SEBASTIEN, N.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (lagerheim) chodat em diferentes meios de cultivo. Revista brasileira de biociências, 2013.

BENAVENTE-VALDÉS, J.; AGUILAR, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTANEZ, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. Biotechnology reports, 2016.

BERNAERTS, T.; GHEYSEN, L.; FOUBERT, I.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. M. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. Biotechnology Advances, 2019.

BHUVANA, P.; SANGEETHA, P.; ANURADHA, V. ALI, M. Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. Oculata* and *C. Vulgaris*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019.



BYRD, S.; BURKHOLDER, J. Environmental stressors and lipid production in *Dunaliella* spp. II. Nutrients, pH, and light under optimal or low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 487, 33–44, 2017.

BORGES, L.; CALDASB, S.; D'OCAB, M.; ABREU, P. C. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports* 4, 164–168, 2016.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, v.70, p.313-321, 1999.

BRINDHADEVI, K.; MATHIMANI, T.; RENE, E.; SHANMUGAM, S.; CHI, N.; PUGAZHENDHI, A. Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel fuel 284, 119058, 2021.

CAMPOS, M.; FIGUEIREDO, T.; SOUSA, L.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial crops and products* 52, 338– 346, 2014.

CARDOSO, L.; DUARTE, J.; ANDRADE, B.; LEMOS, P. V.; COSTA, J. A., DRUZIAN, J. I.; CHINALIA, F. A. *Spirulina* sp. LEB18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: high biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. *Aquaculture* 525, 735272, 2020.

CARDOSO, L.; DUARTE, J.; COSTA, J.A; ASSIS, D.; LEMOS, P. V.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C.; NUNES, I.; CHINALIA, F. A. *Spirulina* sp. as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel. *BioEnergy Research*, 2020.

CERNIGLIA, C; GIBSON, D; BAALEN, C. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *Journal of general microbiology* 116, 495-500, 1980.

CHEN, Y.; TANG, X.; KAPOORE, R.; XU, C.; VAIDYANATHAN, S. Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energy Conversion and Management* 106, 61–72, 2015.

CHI, N.; DUC, P.; MATHIMANI, T.; PUGAZHENDHI, A. Evaluating the potential of green alga *Chlorella* sp. for high biomass and lipid production in biodiesel viewpoint. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* 14 November, 2018.

CHIA, M.; LOMBARDI, A.; MELÃO, M. G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *An Acad Bras Cienc*, 85 (4), 2013.

CHUA, E.; SCHENK, P. A biorefinery for *Nannochloropsis*: induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. *Bioresource Technology*, 2017.

CHURCH, J.; HWANG, J.; KIM, K.; MCLEAN, R.; OH, Y.; NAM, B.; JOO, J.; LEE, W. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella*

*vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. *Bioresource technology* 243, 147–153, 2017.

CORONADO-REYES, J. A.; SALAZAR-TORRES, J. A.; JUÁREZ-CAMPOS, B.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Sci. Technol, Campinas, Ahead of Print*, 2020.

COSTA, J. A.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 603–607, 2002.

COSTA, J. A.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Fatty acids profile the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* grown under different conditions. *Alim. nutr., Araraquara*, v.17, n.4, p.429-436, out./dez, 2006.

COSTA, S.; MIRANDA, A.; MORAIS, M.; COSTA, J. A. DRUZIAN, J. I. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019.

D’ALESSANDRO, E.; ANTONIOSI FILHO, N. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58, 832–841, 2016.

DELIISMAIL, O.; OZDOGRU, B.; SEKER, E. Biofuel production from *Nannochloropsis oculata* microalgae in seawater without harvesting and dewatering over alumina-silicate supported nickel catalysts. *Bioresource Technology Reports* 3, 205–210, 2018.

DUARTE, J.; FANKA, L.; COSTA, J. A. Utilization of simulated flue gas containing CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. *Bioresource Technology* 214, 159–165, 2016.

DUARTE, J.; CARDOSO, L.; SOUZA, C.; NUNES, I.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M.; COSTA, J. A. Brackish groundwater from brazilian backlands in *Spirulina* cultures: potential of carbohydrate and polyunsaturated fatty acid production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2019.

DUDEK, M.; VIK, E.; AANESEN, S.; ØYE, G. Colloid chemistry and experimental techniques for understanding fundamental behaviour of produced water in oil and gas production. *Advances in Colloid and Interface Science* 276, 102105, 2020.

ENAMALA, M.; ENAMALA, S.; CHAVALI, M.; DONEPUDI, J.; YADAVALLI, R.; KOLAPALLIA, B.; ARADHYULA, T.; VELPURI, J.; KUPPAM, C. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94, 49–68, 2018.

FERREIRA, G.; PINTO, L.; MACIEL FILHO, R.; FREGOLENTE, L. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams

and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 109, 448–466, 2019.

FIGUEIREDO, A.; COSTA, E.; SILVA, J.; DOMINGUES, M.R.; DOMINGUES, P. The effects of different extraction methods of lipids from *Nannochloropsis oceanica* on the contents of omega-3 fatty acids *Algal Research* 41, 101556, 2019.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol chem* 226, 497–509, 1957.

FOX, J.; ZIMBA, P. Minerals and trace elements in microalgae. *Microalgae in health and disease prevention*, 2018.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. *Bioresource technology*. 238, 248-253, 2017.

GANF, G.; STONE, S. J.; OLIVER, R. L. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. *aust. j. mar. fresh. res.*, 37, 183-97, 1986.

GAO, F.; PENG, Y.; LI, C.; YANG, G.; DENG, Y.; XUE, B.; GUO, Y. Simultaneous nutrient removal and biomass/lipid production by *Chlorella* sp. in seafood processing wastewater science of the total environment 640–641, 943–953, 2018.

GAO, F.; CUI, W.; XU, J.; LI, C.; JIN, W.; YANG, H. Lipid accumulation properties of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* in membrane photobioreactor (MPBR) fed with secondary effluent from municipal wastewater treatment plant renewable energy 136, 671-676, 2019.

GAI, C.; LIU, Z.; HAN, G.; PENG, N.; FAN, A. Combustion behavior and kinetics of low-lipid microalgae via thermogravimetric analysis. *Bioresource technology*. 181, 148–154, 2015.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F.; ACIEN-FERNANDEZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Microalgae research worldwide. *Algal Research* 35, 50–60, 2018.

GE, S.; QIU, S.; TREMBLAY, D.; VINER, K.; CHAMPAGNE, P.; JESSOP, P. G. Centrate wastewater treatment with *Chlorella vulgaris*: simultaneous enhancement of nutrient removal, biomass and lipid production. *Chemical engineering journal*, 2018.

GÓMEZ-LUNA, L.; ORTEGA-DÍAZ, Y.; TORMOS-CEDENO, L. Effect of pH over growth and cellular viability of *Chlorella vulgaris* Beijerinck local strain, 2021.

GONG, Q.; FENG, Y.; KANG, L.; LUO, M.; YANG, J. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy procedia* 61 (2014) 2012 – 2015.

GRAHAM, E.; DEAN, C.; YOSHIDA, T.; TWARY, S.; TESHIMA, M.; ALVAREZ, M.; ZIDENGA, T.; HEIKOOP, J.; PERKINS, G.; RAHN, T.; WAGNER, G.; LAUR, P. Oil and gas produced water as a growth medium for microalgae cultivation: a review and feasibility analysis. *Algal research*, 2017.

HOPKINS, T.; GRAHAM, E.; SCHWILLING, J.; INGRAM, S.; GOMEZ, S.; SCHULER, A. Effects of salinity and nitrogen source on growth and lipid production for a wild algal polyculture in produced water media. *Algal research* 38, 101406, 2019.

HU, X.; LIU, H.; DENG, Y.; BAO, X.; YANG, A.; ZHOU, J. A novel two-stage culture strategy used to cultivate *Chlorella vulgaris* for increasing the lipid productivity. *Separation and Purification Technology* 211, 816–822, 2019.

HUO, S.; CHEN, J.; ZHU, F.; ZOU, B.; CHEN, X.; BASHEER, S.; CUI, F.; GIAN, J. Filamentous microalgae *Tribonema* sp. cultivation in the anaerobic/oxic effluents of petrochemical wastewater for evaluating the efficiency of recycling and treatment. *Biochemical engineering journal* 145, 27–32, 2019.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.; LACERDA, L. M.; FRANCO, T. Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical engineering and processing* 48, 306–310, 2009.

JAWAHARRAJ, K.; KARPAGAM, R.; ASHOKKUMAR, B.; PRATHEEBA, C.; YARALAKSHMI, P. Enhancement of biodiesel potential in cyanobacteria: using agroindustrial wastes for fuel production, properties and acetyl CoA carboxylase d (ACCD) gene expression of *Synechocystis* sp.nn. *Renewable energy* 98, 72-77, 2016.

JESUS, C.; UEBEL, L.; COSTA, S.; MIRANDA, A.; MORAIS, E.; MORAIS, M.; COSTA, J. A.; NUNES, I.; FERREIRA, E.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. *Bioresource technology* 256, 86–94, 2018.

JIMÉNEZ, S.; MICÓ, M.; ARNALDOS, M.; MEDINA, F.; CONTRERAS, S. State of the art of produced water treatment. *Chemosphere* 192, 186 e 208, 2018.

KADIR, W. N. A., LAM, M. K., UEMURA, Y., LIM, J. W., & LEE, K. T.. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. *Energy Conversion and Management*, 171, 1416–1429, 2018.

KHATOON, H.; HARIS, N.; BANERJEE, S.; RAHMAN, N.; BEGUM, H.; MIAN, S.; ABOL-MUNAFI, A.; ENDUT, A. Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella* sp. isolated from South China Sea at different growth phases. *Process Safety and Environment Protection* 8-4-2017.

KHOEYI, Z.; SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquacult int* 20:41–49, 2012.

KRISNANGKURA, K. A simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. *Jaocs*, vol. 63, no, 4, april, 1986.

KUMAR, K.; PRASANTHKUMAR, S.; RAY, J. Biomass yield, oil productivity and fatty acid profile of *Chlorella lobophora* cultivated in diverse eutrophic wastewaters. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* 11, 338–344, 2017.

KURADE, M.; KIM, J.; GOVINDWAR, S.; JEON, B. H. Insights into microalgae mediated biodegradation of diazinon by *Chlorella vulgaris*: microalgal tolerance to xenobiotic pollutants and metabolism. *Algal research* 20, 126–134, 2016.

LAM, M.; YUSOFF, M.; UEMURA, Y.; LIM, J.; KHOO, C.; LEE, K.; ONG, H. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: growth condition and kinetic studies. *Renewable energy* 103, 197–207, 2017.

LEONG, Y.; CHANG, J.S. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresource Technology* 303, 122886, 2020.

LI, F.; SRIVATSA, S.; BATCHELOR, W.; BHATTACHARYA, S. A study on growth and pyrolysis characteristics of microalgae using thermogravimetric analysis-infrared spectroscopy and synchrotron Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource technology* 229, 1–10, 2017.

LI, K.; LIU, Q.; FANG, F.; LUO, R.; LU, Q.; ZHOU, W.; HUO, S.; CHENG, P.; LIU, J.; ADDY, M.; CHEN, P.; CHEN, D.; RUAN, R. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: a review. *Bioresource Technology*, 2019.

LICHTENTHALER, H. E.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy research gate, nov, 2001.

LIMA, K.; PORTO, P.; FREITAS, R. Métodos de extração de bio-óleo a partir da microalga *Nannochloropsis oculata*: uma análise bibliométrica. *Research, Society and Development*, v. 7, n. 6, p. 01-22, e 976190, 2018.

LIU, J.; PAN, Y.; YAO, C.; WANG, H.; CAO, X.; XUE, S. Determination of ash content and concomitant acquisition of cell compositions in microalgae via thermogravimetric (TG) analysis *algal research* 12, 149–155, 2015.

LIU, F.; TU, T.; LI, S.; CAI, M.; HUANG, X.; ZHENG, F. Relationship between plankton-based b-carotene and biodegradable adaptability to petroleum-derived hydrocarbon *Chemosphere* 237, 124430, 2019.

LU, W.; ALAM, A.; LIU, S.; XU, J.; SALDIVAR, R. Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: a review. *Science of the total environment*, 2019.

MAIA, J. L.; CARDOSO, J.; MASTRANTONIO, D.; BIERHALS, C.; MOREIRA, J.; COSTA, J. A.; MORAIS, M. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol Production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020.

MANSOUR, M.; ABDEL-SHAFY, H.; EL AZAB, W. Innovative reuse of drinking water sludge for the treatment of petroleum produced water to enhance oil recovery. *Egyptian Journal of Petroleum*, 2020.

MATA, S. N. ; CARDOSO, L. G.; ANDRADE, B. B.; DUARTE, J. H; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. *Spirulina sp.* LEB18 cultivation in a raceway type bioreactor using wastewater from desalination process: production of carbohydrate-rich biomass. *Bioresour technol.* 311, 123495, 2020.

MATAMOROS, V.; UGGETTI, E.; GARCIA, J.; BAYONA, J. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 2015.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Formulation of low-cost seawater medium for high cell density and high lipid content of *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 using central composite design in biodiesel perspective. *Journal of Cleaner Production* 198, 575 e 586, 2018.

MATOS, A.; FELLER, R.; MOECKE, E. H.; SANT'ANNA, E. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. *Bioresource technology* 197, 48–55, 2015.

MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World j. microbiol. biotechnol.* 28, 2661–2670, 2012.

MEHTA, P.; RANI, R.; GUPTA, R.; MATHUR, A.; PURI, S. Biomass and lipid production of a novel freshwater thermo-tolerant mutant strain of *Chlorella pyrenoidosa* ncim 2738 in seawater salinity recycled medium. *Algal research* 36, 88–95, 2018.

MONDAL, M., KHAN, A.; HALDER, G. Estimation of biodiesel properties based on fatty acid profiles of *Chlamydomonas sp.* bta 9032 and *Chlorella sp.* bta 9031 obtained under mixotrophic cultivation conditions. *Biofuels*, 2019.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Carbon dioxide mitigation with *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp.* cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 1349–1352, 2007.

MOTTA, A.; BORGES, C.; KIPERSTOK, A.; ESQUERRE, K.; ARAUJO, P.; BRANCO, L. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por

processos de separação por membranas: revisão. Eng. sanit ambient, v.18 n.1, 15-26, jan/mar 2013.

MOUSA, I. E. Total petroleum hydrocarbon degradation by hybrid electrobiochemical reactor in oilfield produced water. *Marine Pollution Bulletin*, 109 (1), 356–360, 2016.

NASCIMENTO, I.; MARQUES, S.; CABANELAS, I.; PEREIRA, S.; DRUZIAN, J.; SOUZA, C.; VICH, D.; CARVALHO, G.; NASCIMENTO, M. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenerg. res.*, 6:1–13, 2013.

NIE, J.; SUN, Y.; ZHOU, Y.; KUMAR, M.; USMAN, M.; LI, J.; SHAO, J.; WANG, L.; TSANG, D. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods, and prospects for future research *Science of the Total Environment* 707, 136080, 2020.

NIEMI, C.; LAGE, S.; GENTILI, F. Comparisons of analysis of fatty acid methyl ester (FAME) of microalgae by chromatographic techniques. *Algal Research* 39, 101449, 2019.

OZÇIMEN, D.; KOÇER, A.; INAN, B.; OZER, T. Bioethanol production from microalgae. *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*, 2020.

OTONDO, A.; KOKABIAN, B.; STUART-DAHL, S.; GUDE, V. G. Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of environmental chemical engineering*, 6 (2), 3213–3222, 2018.

PRIYANKA, P.; KINSELLA, G.; HENEHAN, G.; RYAN, B. Enzymatic in-situ transesterification of neutral lipids from simulated wastewater cultured *Chlorella emersonii* and *Pseudokirchneriella subcapitata* to sustainably produce fatty acid methyl esters. *Bioresource Technology Reports*, 2020.

RAKHMADUMILA, D.; MUNTALIF, B. Artificial produced water as a medium to grow *Chlorella* sp. for biodiesel production. *E3S Web of conferences* 148, 02005, 2020.

RAHMAN, A.; AGRAWAL, S.; NAWAZ, T.; PAN, S.; SELVARATNAM, T. A Review of Algae-Based Produced Water Treatment for Biomass and Biofuel Production. *Water* 12, 2351, 2020.

RAMOS, M.; FERNÁNDEZ, C.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology* 100, 261–268, 2009.

RAJAN, P.; GOPINATH, K.; ARUN, J.; PAVITHRA, K. Hydrothermal liquefaction of *Scenedesmus abundans* biomass spent for sorption of petroleum residues from wastewater and studies on recycling of post hydrothermal liquefaction wastewater. *Bioresource Technology* 283, 36–44, 2019.

REYIMU, Z.; OZÇIMEN, D. Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol Production. *Journal of Cleaner Production* 150, 40 e 46, 2017.

REZASOLTANI, S.; VAHABZADEH, F.; SHARIATMADARI, Z.; GHANATI, F. Cyanobacterial extract as a source of nutrients for mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*. *Algal research* 39, 101480, 2019.

RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of general microbiology* 111, 1-61, 1979.

RICE, E. W.; BRIDGEWATER. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22 ed. Washington (DC): American public health association, 2012.

ROCKEMBACH, C. T.; DIAS, D.; VIEIRA, B. M.; RITTER, M.; SANTOS, M. A. Z.; OLIVEIRA, D. M.; FONTOURA, L.; CRIZEL, M. G.; MESKO, M. F.; SANTOS, V. O. B.; PEREIRA, C. M. P. Síntese do biodiesel derivado do óleo da semente de uva promovida por ultrassom. *Rev. virtual quim.*, 6 (4), 884-897, 2014.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. Chemical absorption and co<sub>2</sub> biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. *bioresource technology*.192, 321–327, 2015.

SABINO, S.; CAMPOS, D.; SANTOS, D.; ANDRADE, L.; OLIVEIRA, H.; CARVALHO, Z. Energias alternativas limpas: um estudo tecnoeconômico do biocombustível de microalgas. *Revista ingi – indicação geográfica e inovação* Vol.5, n.2, p.1212-1223. Abr/Mai/jun, 2021.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, 265–278, 2014.

SANDANI, W.; NISHSHANKA, G.; PREMARATNE, R.; WIJAYASEKERA, S.; ARIYADASA, T.; PREMACHANDRA, J. Comparative assessment of pretreatment strategies for production of microalgae based biodiesel from locally isolated *Chlorella homosphaera*. *Journal of bioscience and bioengineering* 2020.

SARANYA, G.; RAMACHANDRA, T. V. Life cycle assessment of biodiesel from estuarine microalgae. *Energy Conversion and Management*: 8, 100065, 2020.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD\_ALLAH, E. F. Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. *Saudi J Biol Sci*, 2017.



SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International journal of energy research* 35:291–311, 2011.

SERRÀ, A.; ARTAL, R.; GARCÍA-AMORÓS, J.; GÓMEZ, E.; PHILIPPE, L. Circular zero-residue process using microalgae for efficient water decontamination, biofuel production, and carbon dioxide fixation. *Chemical Engineering Journal* 388, 124278, 2020.

SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; KHOEYI, Z. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J Appl Phycol* 23:721–726, 2011.

SHANMUGAM, S.; MATHIMANIC, T.; ANTO, S.; SUDHAKARD, M. P.; KUMARE, S.; PUGAZHENDHIF, A. Cell density, lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacteria for biodiesel production. *Bioresource technology* 304, 123061, 2020.

SHAHID, A.; MALIK, S.; ZHU, H.; XU, J.; NAWAZ, M.; NAWAZ, S.; MD. ALAM.; MEHMOOD, M. A. Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation: a review. *Science of the Total Environment*, 2019.

SHIN, Y.; CHOI, H.; CHOI, J.; LEE, J.; SUNG, Y.; SIM, S. Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 2018.

SILVA, F.; SIQUEIRA, F. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective B.S.A.F Brazil, *New Biotechnology* 39, 90–98, 2017.

SIMÃO, B.; SANTANA JÚNIOR, J.; CHAGAS, B.; CARDOSO, C. Pyrolysis of *Spirulina maxima*: Kinetic modeling and selectivity for aromatic Hydrocarbons. *Algal Research* 32, 221–232, 2018.

SINGH, J.; VYAS, A.; WANG, S.; PRASAD, R. *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications*. Environmental and Microbial Biotechnology, 2020.

SIRIN, S.; SILLANPÄÄ, M. Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel. *Bioresource Technology* 191, 79 – 87, 2015.

SHEKH, A.; SHRIVASTAVA, P.; GUPTA, A.; KRISHNAMURTHI, K.; DEVI, S.; MUDLIAR, S. Biomass and lipid enhancement in *Chlorella sp.* with emphasis on biodiesel quality assessment through detailed fame signature. *Bioresource technology*, 2015.

SOUSA, L.; HORA, D.; SALES, E.; PERELO, L. Cultivation of *Nannochloropsis sp.* in Brackish Groundwater Supplemented With Municipal Wastewater as a Nutrient Source. *Agriculture, Agribusiness and Biotechnology, Braz. arch. biol. technol.* 57, 2, Apr., 2014.

SUASTES-RIVAS, J.; HERNÁNDEZ-ALTAMIRANO, R.; MENA-CERVANTES, V.; GÓMEZ, E.; CHAIREZ, I. Biodiesel production, through intensification and profitable distribution of fatty acid methyl esters by a microalgae-yeast co-culture, isolated from wastewater as a function of the nutrients' composition of the culture media. *Fuel* 280, 118633, 2020.

SUN, Y.; HUANG, Y.; LIAO, Q.; XIA, A.; FU, Q.; ZHU, X.; FU, J. Boosting *Nannochloropsis oculata* growth and lipid accumulation in a lab-scale open raceway pond characterized by improved light distributions employing built-in planar waveguide modules *Bioresource Technology* 249, 880–889, 2018.

TEO, S.; ISLAM, A.; YUSAF, T.; TAUFIQ-YAP, Y. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalgae's oil to biodiesel using calcium methoxide catalyst. *Energy*, 1 e 9, 2014.

THIRUGNANASAMBANTHAM, R.; ELANGO, T.; ELANGOVAN, K. *Chlorella vulgaris* sp. microalgae as a feedstock for biofuel. *Materials today: proceedings*, 2020.

VENDRUSCOLO, R.; FAGUNDES, M.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER, R. Analytical strategies for using gas chromatography to control and optimize microalgae bioprocessing. *Current Opinion in Food Science*, 2019.

VIDYALAXMI, KAUSHIK, G.; RAZA, K. Potential of novel *Dunaliella salina* from sambhar salt lake, India, for bioremediation of hexavalent chromium from aqueous effluents: An optimized green approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180, 430–438, 2019.

VOOREN, G.; LE GRAND, F.; LEGRAND, J.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; PRUVOST, J. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology* 124, 421–432, 2012.

WU, H.; MIAO, X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource technology*, 2014.

XU, D.; WANG, Y.; LIN, G.; GUO, S.; WANG, S.; WU, Z. Co-hydrothermal liquefaction of microalgae and sewage sludge in subcritical water: ash effects on bio-oil production. *Renewable energy* 138, 1143-1151, 2019.

YUAN, D.; YAO, M.; WANG, L.; LI, Y.; GONG, Y.; HU, Q. Effect of recycling the culture medium on biodiversity and population dynamics of bio-contaminants in *Spirulina platensis* mass culture systems. *Algal Research* 44, 101718, 2019.

YAŞAR, F. Comparison of fuel properties of biodiesel fuels produced from different oils to determine the most suitable feedstock type. *Fuel* 264, 116817, 2020.

YUN, C. J.; HWANG, S. S .H; RI, H. G. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* yh703. *Biomass and bioenergy*.127,105277, 2019.

YUSOF, N.; YEONG, Y.; ZAKERI, H.; WAHID, M.; GHAFAR, S.; YUSUF, N. Photoperiod influenced the growth and antioxidative responses of *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chuii*. *Journal of applied pharmaceutical science* vol. 11(04), p. 125-134, april, 2021.

ZHAI, J.; LI, X.; LI, W.; RAHAMAN, H.; ZHAO, Y.; WEI, B.; WEI, H. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater ecological engineering 108, 83–92, 2017.

ZHANG, L.; CHENG, J.; PEI, H.; PAN, J.; JIANG, L.; HOU, Q.; HAN, F. Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. *Renewable energy* 115, 276-287, 2018.

ZHOU, W.; LI, Y.; GAO, Y.; ZHAO, H. Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. *Bioresource technology* 245, 10–17, 2017.

ZHOU, X.; JIN, W.; WANG, Q.; GUO, S.; TU, R.; HAN, S.; CHEN, C.; XIE, G.; QU, F.; WANG, Q. Enhancement of productivity of *Chlorella pyrenoidosa* lipids for biodiesel using coculture with ammonia-oxidizing bacteria in municipal wastewater. *Renewable Energy*, 2019.