



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

DANILO ALVES SILVA

**Produção e Caracterização da biomassa de *Chlorella vulgaris* em Água Produzida**

SALVADOR-BA

2020

DANILO ALVES SILA

**Produção e Caracterização da biomassa de *Chlorella vulgaris* em Água Produzida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Janice Izabel Druzian

Coorientador: Dr Lucas Guimarães Cardoso

SALVADOR-BA

2020

A minha mãe Cleomeide e aos meus irmãos Diego e Cláudio Filho,

As minhas tias Marisa,

Ana, Teca, Claudenice,

As minhas ávos Joana e Glória

Pelo amor e  
apoio incondicional,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo de bom que me tens dado, em especial esse particular momento.

À minha família, minha mãe, meus irmão Cláudio e Diego, pelo apoio material e principalmente emocional.

A professora Dr<sup>a</sup> Janice Izabel Druzian, por ter me acolhido como orientando.

Ao meu coorientador, Lucas Guimarães, por toda a ajuda e orientações fundamentais para a conclusão desse trabalho, sem você eu já teria desistido.

A Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, pelo uso das instalações.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, aos docentes e servidores pelo apoio e dedicação prestados.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

As minhas colegas, JamillaSueira Isabela e Ana, por estarmos juntas em análises, mas entendendo as dificuldades um do outro, apoiando e incentivando mutuamente um ao outro.

Aos meus colegas de turma, Aurora, Andréia, Letícia Fernanda, Thamires, por tornarem essa jornada um pouco mais descontraída, principalmente nos momentos tensos que vivíamos na vida pessoal e na universidade.

Aos colegas Renata Quartiere e JamillaSueira, pelo auxílio, por me terem socorrido em momentos difíceis, compartilhando conhecimentos, experiências, pela convivência, amizade e risadas.

As minhas IC's (Iniciação Científica), maravilhosas Isabela e Ana, por todo apoio, dedicação, confiança e companhia em todas as etapas.

E a todos os que contribuíram de forma direta ou indireta, citados aqui ou não, para o sucesso da realização deste trabalho

*“Qualquer caminho que você decida tomar, existe sempre alguém para te dizer que você está errado. Existem sempre dificuldades surgindo que te tentam a acreditar que as críticas estão corretas. Mapear um caminho e segui-lo até o fim requer...CORAGEM.”*

*Ralph Waldo Emerson*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
1 Objetivo geral .....	13
2 Objetivos específicos .....	13

### **CAPÍTULO I:**

#### **REVISÃO**

<b>BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 Características metabólicas.....	16
2.2 Sistema de produção de microalgas .....	17
2.2.1 Sistemas abertos .....	18
2.2.2 Sistemas fechados .....	19
2.2.3 Sistemas híbridos .....	20
2.3 Crescimento microalgal.....	21
2.4 Composição bioquímica .....	22
2.4.1 Lipídios.....	23
2.4.2 Carboidratos.....	24
2.4.3 Proteínas. ....	25
2.4.4 Cinzas.....	25
2.4.5 Clorofila a e b.....	27
2.4.6 Carotenoides.....	27
2.5 Biocombustíveis.....	28
2.6 Biorremediação .....	30
2.6.1 Água produzida.....	32
2.6.1.1 Filtração .....	34
2.6.1.2 Eletrodialise.....	34
2.6.1.3 Flotação.....	34
2.6.1.4 Adsorção. ....	34
2.6.1.5 Precipitação.....	35
2.6.1.6 Oxidação química.....	35
2.6.1.7 Processo de tratamento baseado em microalgas .....	35
2.7 Considerações finais. ....	38

### **CAPÍTULO II: Caracterização bioquímica e estimativa teórica de biocombustíveis da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em água produzida**

<b>RESUMO</b> .....	<b>49</b>
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>51</b>
2 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
Coleta e composição química da água produzida.....	52
Preparação e obtenção do inóculo.....	53
Condições de cultivo e fluxograma experimental.....	54
Parâmetros de crescimento .....	55
Composição bioquímica da biomassa .....	55

Composição de ácidos graxos.....	57
Avaliação das propriedades do biodiesel.....	58
Conversão teórica de carboidratos da biomassa em etanol.....	58
Análise termogravimétrica .....	58
Análise estatística.....	58
<b>3 RESULTADOSEDISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
Parâmetros de crescimento e determinação de pH.....	61
Composição bioquímica da biomassa .....	64
Conversão teórica de carboidratos da biomassa em etanol .....	68
Composição de Ácidos Graxos.....	69
Avaliação das propriedades do biodiesel .....	71
Análise termogravimétrica .....	74
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Composição química de diferentes microalgas .....	14
<b>Tabela 2.</b> Características dos sistemas fechados (fotobiorreatores) e abertos.....	18
<b>Tabela 3.</b> Vantagens e desvantagens do sistema aberto e fechado de cultivo de microalgas...21	
<b>Tabela 4.</b> Macronutrientes e funções biológicas.....	23
<b>Tabela 5.</b> Vantagens e desvantagens de alguns processos de biorremediação.....	31
<b>Tabela 6.</b> Potencial biorremediador de espécies de microalgas sobre diversos compostos.....	32

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Composição química da água produzida .....	52
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros cinéticos de produção de biomassa ( $\text{gL}^{-1}$ ), crescimento específico ( $\text{d}^{-1}$ ) e produtividade de biomassa ( $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) de <i>Cholrella vulgaris</i> .....	60
<b>Tabela 3.</b> Composição de ácidos graxos de <i>Cholrella vulgariss</i> .....	66
<b>Tabela 4.</b> Propriedades de biodiesel da biomassa de <i>Cholrella</i> .....	68



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Fotossíntese das microalgas verdes. ....	16
<b>Figura 2.</b> Sistemas abertos de cultivo de microalgas, (A) tanque circular sem sistema de aeração e (B) tanque tipo raceway com sistema de aeração por aeradores .....	19
<b>Figura 3.</b> Sistemas fechado (fotobiorreator) de cultivo de microalgas .....	20
<b>Figura 4.</b> Sistema misto para o cultivo de microalgas (características de (1) sistema turf scrubber, (2) sistema em tanques e (3) fotobiorreator) .....	21
<b>Figura 5.</b> Curva de crescimento de microrganismos.....	22

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Fluxograma experimental e caracterização da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	54
<b>Figura 2.</b> Produção de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	58
<b>Figura 3.</b> Composição bioquímica(A) e pigmentos (B) de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	62
<b>Figura 4.</b> Análise termogravimétrica da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	71

## RESUMO GERAL

A crescente industrialização tem provocado alterações no meio ambiente, em especial os recursos hídricos, que tem apresentado elevadas concentrações de compostos químicos, oriundos de atividades urbanas, agrícolas e industriais, através da produção de águas residuais. Atualmente, existem diversos tipos de efluentes industriais, baseados nos inúmeros tipos de contaminantes ambientais e indústrias. Dentre esses efluentes, está a água produzida (AP), gerada a partir da extração do petróleo, é proveniente do poço perfurado, portanto possui uma composição complexa contendo compostos químicos orgânicos e inorgânicos. Sua produção aumenta à medida que ocorre o declínio na produção de óleo e gás, assim, para extração do petróleo bruto é necessário aumentar a quantidade de água introduzida. Dentre os tratamentos empregados para tratar a AP, a utilização de microalgas, possibilita reduzir impactos ambientais, devido ao perfil biorremediador, além de produzir biomoléculas de interesse comercial. O gênero *Chlorella* tem grande potencial biotecnológico devido ao seu perfil metabólico, que é capazes de produzir grandes quantidades de proteínas, carotenóides (astaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina e zeaxantina), vitaminas, minerais, antioxidantes, polissacarídeos, peptídeos e ácidos graxos. É considerada uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis, conhecidos como terceira geração. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi produzir e caracterizar a biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada com suplementação diária de água produzida (AP), visando além do conhecido caráter biorremediador da espécie microalgal, verificar a produção de biomoléculas de interesse comercial. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* contendo 1,5 L de meio BG11, submetido ao tratamento AP (suplementação diária com 50 mL de água produzida não autoclavada) e AD (suplementação diária com 50 mL de água destilada) durante 26 d. A produção de biomassa foi 4,87; 1,69 e 1,95 gL<sup>-1</sup> no tratamento controle, AP e AD, respectivamente. Os valores de  $\mu_{\text{específico}}$  e de produtividade para o Controle, AD e AP, foram respectivamente (0,24; 0,34 e 0,25 d<sup>-1</sup>) e (0,03; 0,04 e 0,01 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). A biomassa do tratamento AP apresentou maior teor de carboidratos (40,19%), em relação ao controle (17,00%) e AD (22,50%). Os valores de clorofila a e b para AP variaram de 0,65 e 0,42  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  e carotenoides 2,4  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao Controle (1,20 (clorofila a), 0,80 (clorofila b) e 3,40  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  carotenoides), e AD (0,30 clorofila a; 0,20 clorofila b e 0,90  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  carotenoides). O teor de lipídios de AD (24,08%) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparado a AP (21,53%) e controle (21,37%). A produção de bioetanol em AP (18,22 mL/100g de biomassa) foi maior quando comparado a AD (10,20 mL/100g de biomassa) e ao controle (7,70 mL/100g de biomassa). O perfil de ácidos graxos de AP foi majoritariamente composto de monoinsaturados (48,52%), enquanto AD (49,71%) e controle (50,23%) saturados. AP apresentou maior teor de ácido palmítico (5,42 mg·g<sup>-1</sup>);  $\gamma$ -linolênico (3,02 mg·g<sup>-1</sup>) e linolelaídico (1,94 mg·g<sup>-1</sup>). Quanto as propriedades de biodiesel, AP apresentou número de cetano (49,22%) e valor de iodo (101,32g iodo/100g) de acordo as normas. Os níveis de saponificação 211,97 comparados a biocombustíveis de 1ª geração, apenas o ponto de entupimento, foi ligeiramente superior (22,48°C) ao preconizado pela legislação. Além disto, uma alta eficiência de remoção de metais pesados como Cobre (Cu), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Zinco (Zn) e Ferro (Fe) que obtiveram eficiência de remoção de 70,00%, 76,89%, 97,82%, 96,55% e 90,74% respectivamente, e remoção de hidrocarbonetos totais (HTP) de 48,59%. Portanto, a microalga *Chlorella vulgaris* é uma alternativa promissora para biorremediar compostos químicos da água produzida, gerando biomassa que pode ser utilizada como substrato para a produção de biocombustíveis, como demonstrado no tratamento AP utilizando água residual da indústria petrolífera.

**Palavras chaves:** Biocombustíveis, composição centesimal, pigmentos, ácidos graxos, microalgas, biorremediação.

## ABSTRACT

The growing industrialization has caused changes in the environment, especially water resources, which has shown high concentrations of chemical compounds, coming from urban, agricultural and industrial activities, through the production of waste water. Currently, there are several types of industrial effluents, based on the numerous types of environmental contaminants and industries. Among these effluents, there is the water produced (AP), generated from the extraction of oil, it comes from the drilled well, therefore it has a complex composition containing organic and inorganic chemical compounds. Its production increases as the production of oil declines. oil and gas, therefore, for the extraction of crude oil it is necessary to increase the amount of water introduced. Among the treatments used to treat PA, the use of microalgae makes it possible to reduce environmental impacts, due to the bioremediation profile, in addition to producing biomolecules of commercial interest. The *Chlorella* genus has great biotechnological potential due to its metabolic profile, which is capable of producing large amounts of proteins, carotenoids (astaxanthin, lutein,  $\beta$ -carotene, violaxanthin and zeaxanthin), vitamins, minerals, antioxidants, polysaccharides, peptides and fatty acids . It is considered a promising source for the production of biofuels, known as the third generation. In this context, the objective of this study was to produce and characterize the *Chlorella vulgaris* biomass cultivated with daily supplementation of produced water (AP), aiming beyond the well-known bioremediation character of the microalgal species, to verify the production of biomolecules of commercial interest. Cultures were carried out in Erlenmeyer-type photobioreactors containing 1.5 L of BG11 medium, submitted to AP (daily supplementation with 50 mL of non-autoclaved water) and AD (daily supplementation with 50 mL of distilled water) treatment for 26 d. Biomass production was 4.87; 1.69 and 1.95 gL<sup>-1</sup> in the control treatment, AP and AD, respectively. The values of  $\mu$  specific and productivity for the Control, AD and AP, were respectively (0.24; 0.34 and 0.25 d<sup>-1</sup>) and (0.03; 0.04 and 0.01 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). The biomass of the AP treatment had a higher carbohydrate content (40.19%), compared to the control (17.00%) and AD (22.50%). The values of chlorophyll a and b for AP ranged from 0.65 to 0.42  $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$  and carotenoids 2.4  $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$ , showing a significant difference ( $p < 0.05$ ) when compared to the Control (1.20 ( chlorophyll a), 0.80 (chlorophyll b) and 3.40  $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$  carotenoids), and AD (0.30 chlorophyll a; 0.20 chlorophyll b and 0.90  $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$  carotenoids). of AD lipids (24.08%) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to AP (21.53%) and control (21.37%). The production of bioethanol in AP (18.22mL / 100g of biomass) was higher when compared to AD (10.20 mL / 100g of biomass) and to the control (7.70 mL / 100g of biomass). The fatty acid profile of AP was mostly composed of monounsaturated (48.52%), while AD (49.71%) and control (50.23%) saturated. AP showed a higher content of palmitoleic acid (5.42 mg·g<sup>-1</sup>);  $\gamma$ -linolenic (3.02mg·g<sup>-1</sup>) and linolelaidic (1.94 mg·g<sup>-1</sup>). As for the biodiesel properties, AP presented cetane number (49.22%) and iodine value (101.32g iodine / 100g) according to the norms. The levels of saponification 211.97 compared to 1st generation biofuels, only the plugging point, was slightly higher (22.48 ° C) than recommended by the legislation. In addition, a high removal efficiency of heavy metals such as Copper (Cu), Manganese (Mn), Molybdenum (Mo), Zinc (Zn) and Iron (Fe) which obtained removal efficiency of 70.00%, 76.89 %, 97.82%, 96.55% and 90.74% respectively, and 48.59% total hydrocarbon removal (HTP).Therefore, the microalgae *Chlorella vulgaris* is a promising alternative for bioremediation of chemical compounds in the water produced, generating biomass that can be used as a substrate for the production of biofuels, as shown in the AP treatment using wastewater from the oil industry.

**Keywords:** *Biofuels, chemical composition, pigments, fatty acids, microalgae, bioremediation.*

## INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global, ameaça a existência e questiona a capacidade de sobrevivência da humanidade (Elrayies, 2018). A partir do ano de 2030 o mundo enfrentará um déficit hídrico de 40%, o que é um desafio no desenvolvimento social e econômico (Sun *et al.*, 2016). Esse déficit pode decorrerá do aumento da demanda por água, contaminação dos recursos hídricos, aumento da água residual e falta de tecnologias para recuperar a água descartada nos mais variados processos (Li *et al.*, 2019).

Anos de urbanização e a crescente industrialização influenciaram a estrutura do meio ambiente e os recursos hídricos, de forma a inserir compostos químicos como nitrogênio e fósforo em concentrações elevadas. O excesso destes compostos são gerados por atividades urbanas, agrícolas e industriais (Li *et al.*, 2019; Cai *et al.*, 2013; Kumar e Pal, 2015). Existem diversos tipos de efluentes industriais com bases nos inúmeros tipos de contaminantes e indústrias (ferro e aço, têxtil e couro, papel e celulose, petroquímica e refinarias, química, metais não ferrosos, microeletrônica e o de mineração) (Shi, 2014). Dentre esses efluentes, está a água produzida, que é gerada a partir da extração do petróleo (Jaén-Gil *et al.*, 2020; Al-Ghouti *et al.*, 2019; Ammare *et al.*, 2018).

A água proveniente do poço possui uma composição complexa contendo sal, sólidos dissolvidos totais (TDS) ou condutividade elétrica; óleo e graxa (O&G); hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), fenóis, ácidos orgânicos, compostos orgânicos e inorgânicos (cálcio, magnésio, sulfatos e bário); materiais radioativos de ocorrência natural, aditivos químicos, como inibidores de corrosão, que são usados durante a perfuração, fraturamento e processo de operação do poço (Jaén-Gil *et al.*, 2020; Al-Ghouti *et al.*, 2019; Graham *et al.*, 2017).

A geração de água produzida em campos petrolíferos é responsável por até 10-20 vezes o volume de petróleo produzido e, aproximadamente, estima-se que a produção a nível global seja de  $39,5 \text{ Mm}^3 \text{ dia}^{-1}$  podendo ser doze vezes mais até 2025 (Jaén-Gil *et al.*, 2020; e Al-Ghouti *et al.*, 2019).

Além disso, com o aumento da idade do poço aliado ao declínio da produção de óleo e gás, aumentam a quantidade de água introduzida no poço e conseqüentemente, a água produzida, podendo chegar a um volume de 98% em campos quase esgotados, produzindo cerca de 2% de combustível fóssil ( Al-Ghouti *et al.*, 2019).

Os efeitos nocivos desta água no ecossistema são: o aumento da quantidade de sal, maior concentração de metais e maior quantidade de emissão de óleo disperso e solúvel na água do mar (Ammar *et al.*, 2018; Fakhru'l-Razi *et al.* 2009). Autores como Lam *et al.* (2017) demonstraram que a utilização desta água residual como fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas, possibilita reduzir impactos ambientais. Visto que a aplicação de microalgas nos processos de biorremediação de efluentes líquidos industriais possibilita a remoção de compostos químicos orgânicos e inorgânicos e nutrientes. Além disso a biomassa, produzida possibilita a produção de grandes quantidades de proteínas e óleos de interesse industrial (Dias *et al.*, 2019).

Dentre estas microalgas, o gênero *Chlorella* é considerada uma das mais promissoras para fins biotecnológicos, devido ao grande potencial como futuros produtores de bioenergia industrial e para biorremediação de diferentes águas residuais, devido à sua robustez, alto teor de lipídios, condição de cultura mixotrófica, alta taxa de crescimento sob condições adversas e tolerante a altos níveis de metais pesados (Silva *et al.*, 2019; Zhigang *et al.*, 2013). Além disto, possui um ciclo de vida simples e vias metabólicas similares a de vegetais superiores, sendo capazes de produzir grandes quantidades de proteínas, carotenóides (astaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina e zeaxantina), vitaminas, minerais, antioxidantes, polissacarídeos, peptídeos e ácidos graxos. É considerada uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis, conhecidos como terceira geração (Silva *et al.*, 2019; Mata *et al.*, 2010).

## **OBJETIVOS**

### **1 Objetivo geral**

- Produzir e caracterizar a biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG11 suplementada diariamente com água produzida e estimar os biocombustíveis.

### **2 Objetivos específicos**

- Produzir biomassa de *Chlorella vulgaris* em água produzida;
- Avaliar cinética de produção da microalga frente ao tratamento;
- Caracterizar a composição bioquímica da biomassa;
- Determinar a composição de Ácidos Graxos;
- Estimar a produção de bioetanol a partir do teor de carboidratos;
- Avaliar as propriedades teóricas de biodiesel.

## CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2. MICROALGAS

Microalgas são microrganismos fotossintéticos unicelulares compostos por quatro grupos principais com base na pigmentação, produtos de armazenamento fotossintético, membrana fotossintética e morfologia: estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes nas Divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*; estrutura celular eucariótica, com representantes nas Divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta* (*Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae* etc), *Cryptophyta* e *Dinophyta*, (Patel *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2009; Derner *et al.*, 2006; Hoeket *al.*,1995) estando distribuídas tanto em ambientes marinhos quanto em água doce (Pérez-Lloréns, 2020; Andrade e Colozzi Filho, 2014).

Segundo Klin *et al.* (2020) e Zamalloa *et al.* (2011), a alta taxa de crescimento desses organismos está associada à eficiência da conversão da energia solar em biomassa. Diante disso, sua morfologia unicelular permite rápida adaptação e colonização em diversos ambientes. Além disso, a diversidade da composição bioquímica está relacionada diretamente a espécie, gênero, fatores abióticos e ao meio de cultura (Klin *et al.*, 2020; Niccolai *et al.*, 2019; Miao e Wu 2006). Esta diversidade pode ser observada na Tabela 1, onde são apresentadas diversas espécies de microalgas e cianobactérias, juntamente com a concentração bioquímica.

**Tabela 1** Composição química de diferentes microalgas

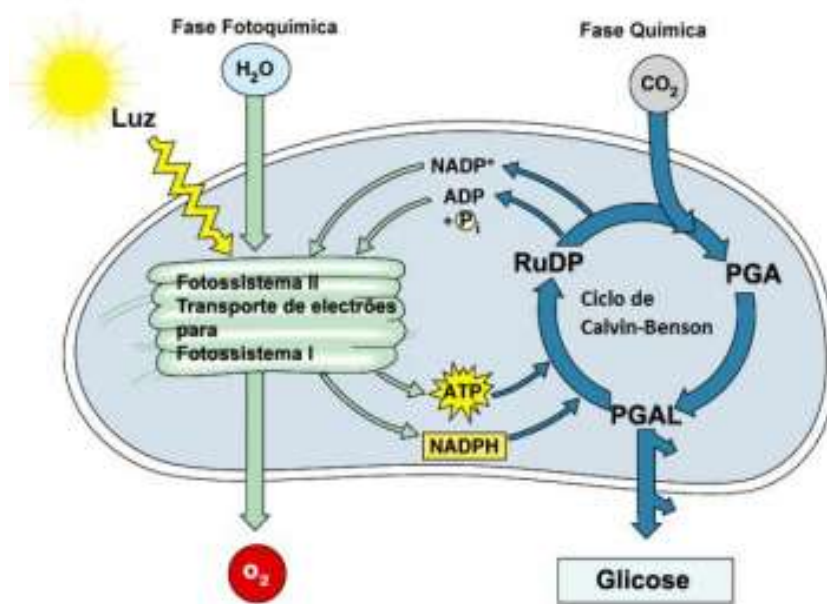
Microalgas/ Cianobactérias	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Ácidos nucleicos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	38-58	8-27	5-28	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-

<i>Porphyridium cruentum</i>	20-57	12-57	5-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-14	2-5
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-
<i>Diacronema vlkianum</i>	24-39	15-31	18-39	-
<i>Dunaliella</i> sp.	27-57	14-41	6-22	-
<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>Odontella aurita</i>	9-28	30-54	13-20	-
<i>Pavlova lutheria</i>	16-43	15-53	6-36	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	13-40	6-35	14-39	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	31-56	6-28	8-21	-
<i>Schizochytrium</i> sp.	10-14	12-24	46-74	-
<i>Tetraselmis</i> sp.	14-58	12-43	8-33	-

Fonte: Adaptada de Bernaerts *et al.*, 2019 e Becker *et al.*, 1994

A síntese de compostos celulares das microalgas é dinamizada por mecanismos metabólicos. Algumas microalgas, como as verdes (*Chloropyta*) (Figura 1), detêm um sistema que captura energia solar através de fótons, isso ocorre, devido a um coletor de luz, ligado à clorofila e ao carotenoide. O fotossistema II utiliza essa energia na oxidação catalítica da água, liberando moléculas de O<sub>2</sub>, elétrons e prótons (Liu *et al.*, 2019; Beer *et al.*, 2009). Em seguida são transferidos os elétrons de baixo potencial através da cadeia de transportes fotossintéticos, que reduzem a ferredoxina em formação de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). A formação do gradiente eletroquímico acontece devido a liberação de prótons após a água oxidar-se para o lúmen do tilacóide, onde será utilizado para a formação de Adenosina Trifosfato (ATP) via ATP sintase. Os substratos NADPH e ATP formado através da fotossíntese, fazem parte do ciclo de Calvin-Benson, onde o CO<sub>2</sub> é fixado em moléculas de três átomos de carbono, sendo assimilados em moléculas necessárias para o crescimento celular (Liu *et al.*, 2019; Beer *et al.*, 2009).





**Figura 1.** Fotossíntese das microalgas verdes. Fonte: : <http://portalghp.altervista.org/>

## 2.1 Características metabólicas

O metabolismo microalgal pode ser dividido em fotoautótrofico, heterotrófico e mixotrófico (Tabela 2), diferenciados entre si pela necessidade ou não de energia luminosa e uma fonte de carbono orgânica ou inorgânica.

*Fotoautotrófico* – utilizam uma fonte de carbono inorgânica como monóxido e dióxido de carbono disponíveis no ambiente ou carbonatos presentes em efluentes industriais ou meios de cultura e luz como fonte de energia. A energia química produzida através da fotossíntese ocorre através da assimilação do carbono nos cloroplastos, os convertendo em O<sub>2</sub> e ATP (Liu *et al.*, 2019; BEER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008). No estudo conduzido por Wang *et al.*, 2014, o cultivo fotoautotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* foi realizado com meio F-otimizado com nitrogênio, fósforo e íon de ferro. Os resultados mostraram que o meio otimizado em condições internas quanto externas foram significativamente iguais após a otimização na produção de biomassa (1,09 gL<sup>-1</sup>), lipídios (29, 1%) e produtividade lipídica (73,3 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

- *Heterotrófico* – Através de rotas específicas os microrganismos crescem no escuro, utilizando uma fonte exógena de carbono, substituindo o aporte tradicional de CO, CO<sub>2</sub> e energia luminosa em condições fotossintéticas. (Torres-Tiji *et al.*, 2020; Andrade e Colozzi Filho, 2014; BEER *et al.*, 2009). Além disto, utilizam compostos orgânicos como glicose e acetatos, como uma fonte principal de energia e de carbono para seu crescimento.

De acordo com Canelli *et al.* (2020) a *Chlorella vulgaris* quando cultivada heterotroficamente em biorreator de tanque agitado de 16 L. A biomassa apresentou menor oxidação lipídica na fase estacionária que na fase exponencial, indicando boa estabilidade oxidativa, no entanto a bioacessibilidade lipídica foi de  $0,66\% \pm 0,16\%$  e  $2,41\% \pm 0,61\%$  para as fases exponenciais e estacionária, respectivamente.

*Mixotrófico* - A fotossíntese é a principal fonte de energia, podendo envolver a utilização de compostos inorgânicos e/ou orgânicos (Patel *et al.*, 2019; Brennan e Owende, 2010; Chen *et al.*, 2011). Segundo Mata *et al.* (2010), o metabolismo anfitrófico é um subtipo de mixotrofia que possui capacidade de viver fotoautotróficamente ou heterotróficamente dependendo da intensidade de luz, bem como da concentração de compostos orgânicos. De acordo com Wang *et al.* (2019) foi realizado um cultivo mixotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* em fermentadores semicontínuos de 5 e 50 L contendo um efluente de esgoto com alto teor de amônio e sal. Os resultados demonstraram que os maiores teores de proteína (56,7%), pigmentos totais (4,48%) e produtividades de  $5,62 \text{ gL}^{-1}$ , foram obtidos no fermentador de 5L, enquanto taxa de consumo máximo  $\text{NH}_4^+$  ( $1.800 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e rendimento de biomassa ( $23,6 \text{ gL}^{-1}$ ) foram obtidos em fermentador de 50 L.

## 2.2 Sistemas de produção de microalgas

O cultivo de microalgas no meio ambiente requer fonte de carbono e luz solar para realizar fotossíntese, mas em produção em larga escala pode necessitar de suprimentos adicionais como:  $\text{CO}_2$ , N, F. Características morfológicas de cada espécie devem ser consideradas para a escolha do sistema de cultivo (Andrade e Colozzi Filho, 2014; Spolare *et al.*, 2006).

Os principais sistemas de cultivo de microalgas são os sistemas abertos (lagoas e tanques), os fechados (fotobiorreatores) e os mistos (híbridos) (Tabela 2). Esses sistemas têm como primazia o controle de parâmetros físicos que viabilizam a produção de produtos e subprodutos de interesse alimentar e industrial (Andrade e Colozzi Filho, 2014; Spolare *et al.*, 2006).

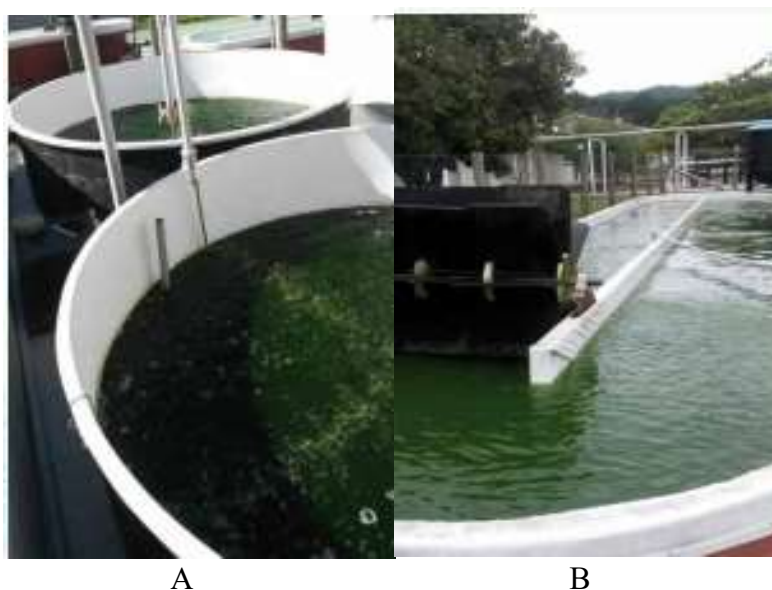
**Tabela 2.**Características dos sistemas fechados (fotobiorreatores) e abertos.

<b>Sistemas de cultivo</b>	<b>Sistemas fechados</b>	<b>Sistemas abertos</b>
<b>Controle de contaminação</b>	Possível	Difícil
<b>Risco de contaminação</b>	Reduzido	Alto
<b>Axenia</b>	Possível	Difícil
<b>Controle do processo</b>	Possível	Difícil
<b>Mistura</b>	Uniforme	Pobre
<b>Área/volume</b>	Alto	Baixo
<b>Concentração de células</b>	Alta	Baixa
<b>Investimento</b>	Alto	Baixo
<b>Custos de operação</b>	Alto	Baixo
<b>Controle da temperatura</b>	Mais uniforme	Difícil
<b>Produtividade</b>	3 a 5 vezes mais produtivo	Pobre
<b>Espaço requerido</b>	Depende da produtividade	Equivalente
<b>Estresse hidrodinâmico</b>	Médio	Muito baixo
<b>Evaporação do meio de cultivo</b>	Baixa	Alta
<b>Controle da transferência de gás</b>	Alta	Baixa
<b>Eficiência da utilização da luz</b>	Alta	Pobre

Fonte: Adaptado de Mata *et al.*, 2010

### 2.2.1 Sistemas abertos

Utilizados desde a década de 1960 no Japão, os sistemas de cultivo abertos (Figura 2), foram os primeiros a serem criados e são amplamente difundidos e aceitos (Rico, 2014; Borowitzka, 1999). Esses sistemas são de grande porte e permitem produzir uma grande quantidade de biomassa. Devem possuir pequena profundidade, variando de 15 a 30cm possibilitando incidência de luz adequada em todo seu volume. A variação de profundidade possibilita um menor uso da quantidade de água, tornando mais econômico e prático o processo de recuperação da biomassa (Andrade e Colozzi Filho, 2014; Benemann *et al.*, 1996). No entanto, um grande volume de CO<sub>2</sub> é perdido devido à oscilação de temperatura e evaporação. De acordo com Xu *et al.* (2009) as perdas de CO<sub>2</sub> podem ser compensadas através da instalação de dispositivos de aeração aumentando eficiência no uso do gás. Nesse modelo de sistema os nutrientes e a microalga são inseridos na parte central do tanque, no qual garante distribuição homogênea, devido ao sistema de recirculação que evita a sedimentação dos microorganismos (Andrade e Colozzi Filho, 2014; Terry, Raymond, 1985).



**Figura 2** - Sistemas abertos de cultivo de microalgas, (A) tanque circular sem sistema de aeração e (B) tanque tipo raceway com sistema de aeração por aeradores.

Fonte: Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153095/1/Agroenergia-Revista-microalgas-ed10-red.pdf>; Acesso em 17 de agosto 2020

Os sistemas abertos podem ser extensivos e intensivos. Extensivos quando o manejo da cultura não requer nenhum esforço, já o intensivo, tem como intuito aumentar a produtividade e melhorar as condições de cultivo. Barbosa (2012) afirma que há possibilidade do crescimento de outras espécies de organismos diminuem a produtividade do cultivo provocado pela contaminação devido ao crescimento de outras espécies de organismos (bactérias e outras espécies de microalgas). De acordo com Andrade e Colozzi Filho (2014); Brennan e Owende (2010), esse sistema é utilizado quando o crescimento das microalgas ocorre em condições ambientais consideradas extremas, como é o caso *Spirulina sp* (sobrevive a pH alcalino), e da *Dunaliella sp* (cresce em alta salinidade).

### 2.2.2 Sistemas fechados

Segundo Soares (2010) o desenvolvimento dos fotobiorreatores em sistemas fechados, aconteceu devido às limitações dos sistemas abertos. A produção da biomassa nesse sistema é realizada em recipientes fechados de policarbonato, plástico ou vidro, sendo necessária a inserção dos nutrientes para o desenvolvimento das microalgas (Franco *et al.*, 2013; Soares, 2010). Esses recipientes fechados diminuem os efeitos de evaporação, contaminação, possibilitando um maior controle da intensidade da luz e temperatura, assim, favorecendo maior crescimento das células (Franco *et al.*, 2013; Barbosa, 2012).

No entanto, esses sistemas apresentam algumas restrições como o risco de superaquecimento,

entupimento, acúmulo de oxigênio, alto preço da manutenção do cultivo, funcionamento e das instalações (Jacome-Pilco *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2013; Soares, 2010). As instalações podem ser feitas em ambientes cobertos ou ao ar livre. Nos cultivos em locais abertos a luz solar é aproveitada para o desenvolvimento da microalga, no entanto, em ambientes fechados há duas possibilidades: casas de vegetação e locais opacos. Nessas casas de vegetação as paredes e o teto são transparentes, permitindo a passagem da luz solar e os locais opacos a energia luminosa é proveniente de lâmpadas fluorescentes (Lourenço, 2006).

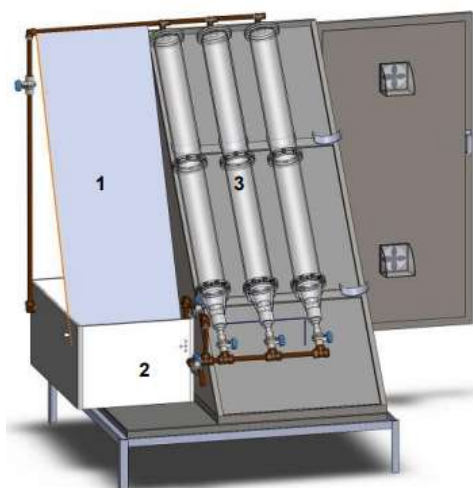


**Figura 3** - Sistemas fechado (fotobiorreator) de cultivo de microalgas

Fonte: Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153095/1/Agroenergia-Revista-microalgas-ed10-red.pdf>; Acesso em 17 de agosto 2020

### 2.2.3 Sistemas Híbridos

È a combinação dos sistemas abertos e fechados, desenvolvidos com o objetivo de diminuir as desvantagens e maximizar as vantagens contrapondo os sistemas de maneira individualizada (Rodolfi *et al.*, 2008). O sistema fechado devido as condições controladas estimula a divisão celular e reduz o risco de contaminação por outros microrganismos. O cultivo aberto tem como finalidade a síntese de biomoléculas, através da exposição das células ao estresse nutricional (Huntley, Redalje, 2007). Neste contexto, a associação destes sistemas, provavelmente é a escolha mais lógica para oferecer um melhor custo-benefício (Demirbas *et al.*, 2011).



**Figura 4** - Sistema misto para o cultivo de microalgas (características de (1) sistema turf scrubber, (2) sistema em tanques e (3) fotobiorreator). Fonte: Bjerk, 2012.

A Tabela 3 demonstra de acordo com os parametros de cultivo as vantagens e desvantagens de produzir microalgas em sistemas abertos e fechados.

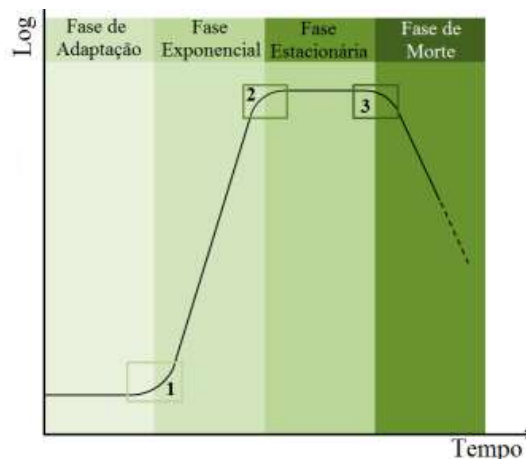
**Tabela 3** - Vantagens e desvantagens do sistema aberto e fechado de cultivo de microalgas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Sistema aberto</b>	<b>Sistema fechado</b>
<b>Riscos de contaminação</b>	desvantagem	vantagem
<b>Perdas de CO<sub>2</sub></b>	desvantagem	vantagem
<b>Perdas evaporativas</b>	desvantagem	vantagem
<b>Eficiência do uso da luz</b>	desvantagem	vantagem
<b>Razão Área/Volume</b>	vantagem	desvantagem
<b>Área requerida</b>	desvantagem	vantagem
<b>Controle de Processo</b>	desvantagem	vantagem
<b>Produtividade de Biomassa</b>	desvantagem	vantagem
<b>Custos de investimento</b>	vantagem	desvantagem
<b>Custos de operação</b>	vantagem	desvantagem
<b>Custos de manutenção</b>	desvantagem	vantagem
<b>Scale up (escalonamento)</b>	vantagem	desvantagem
<b>Produção de biomoléculas</b>	desvantagem	vantagem

Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2006) e Ortiz (2014).

## 2.3 Crescimento microalgal

O crescimento das microalgas está ligado diretamente a fatores físicos, químicos e biológicos. Esses três fatores estão relacionados à presença de contaminantes, efeitos provocados pela disponibilidade de fontes de carbono, nutrientes, temperatura, pH e luminosidade (Rico, 2014; Longhi, 2012; Andrade, 2014; Kumar *et al.*, 2010). Uma curva de crescimento de micro-organismos engloba fases como: adaptação (lag), exponencial (log) estacionária e declínio (morte, senescência).



**Figura 4** –Curvade crescimento de micro-organismos.

Fonte: <https://brainly.com.br/tarefa/13364102>

A Figura 4 apresenta as fases de crescimento: fase lag, exponencial, estacionária e de morte (Huo *et al.*, 2020; Vidotti, 2012; Mata *et al.*, 2010; Schmidell *et al.*, 2001). A fase lag ou de adaptação metabólica é definida como o período em que o número de organismos permanece praticamente inalterado, é a fase de adaptação ao novo ambiente. Na fase exponencial de crescimento, a máxima taxa de crescimento específica é alcançada e é caracterizada por um aumento significativo da massa celular (Huo *et al.*, 2020; Klin *et al.*, 2020). Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes essenciais e possível acúmulo de metabólitos tóxicos. Depois da fase exponencial tem-se a fase de crescimento estacionário, na qual a máxima concentração celular é alcançada e a taxa de crescimento específica é continuamente reduzida. A fase de morte ou declínio é aquela em que a maioria das células está em processo de morte. (Huo *et al.*, 2020; Klin *et al.*, 2020; Vidotti, 2012; Mata *et al.*, 2010; Schmidell *et al.*, 2001).

## 2.4 Composição Bioquímica

Os macros e micronutrientes são fundamentais para o cultivo de microalgas. No ambiente natural a distribuição desses elementos químicos é irregular (Gloria, 2018; Corrêa, 2015; Andrade,

2014; Richmond, 2004). A suplementação de micros e macronutrientes (Tabela 4) são necessários na produção de microalgas em sistemas fechados e abertos (Gloria, 2018; Andrade, 2014; Richmond, 2004).

**Tabela 4** - Macronutrientes e funções biológicas.

<b>Componente</b>	<b>Função biológica</b>
<b>Carbono</b>	Componente estrutural de macromoléculas
<b>Nitrogênio</b>	Componente estrutural de macromoléculas
<b>Fósforo</b>	Realização de processos de troca energética (ATP)
<b>Potássio</b>	Regulação osmótica
<b>Magnésio</b>	Constituinte da molécula de clorofila
<b>Enxofre</b>	Estruturação de proteínas, como cisteína e metionina
<b>Ferro</b>	Participação da via de biossíntese da clorofila

Fonte: Adaptado de Grobbelaar (2004).

Além dos macronutrientes, os micronutrientes, também conhecidos como elementos traços são necessários, mesmo em quantidades menores quando comparados as macronutrientes, sendo os elementos cobalto (Co), cobre (Cu), manganês (Mn), molibdênio (Mo), zinco (Zn) e ferro (Fe) os principais (Gloria, 2018; Andrade, 2014; Richmond, 2004).

As microalgas tem sido objeto de estudo pela sua capacidade de ser utilizada no desenvolvimento de alimentos funcionais e no aproveitamento do CO<sub>2</sub> atmosférico. Além disso, Chacon e Marino (2010) demonstram que a biomassa é composta de proteínas, lipídios e carboidratos de interesse farmacêutico, alimentício e bicomustíveis (biodiesel e etanol).

Aditivamente, autores como Niccolai *et al.* (2019); Pulz e Gross (2004), demonstraram que os pigmentos (carotenóide, ficobiliproteínas) presentes nas microalgas, possuem propriedades protetoras e antioxidantes. De acordo com os autores esses pigmentos atuam como um mecanismo de defesa a formação de radicais livres e oxidação.

#### 2.4.1 Lipídios

São biomoléculas compostas por carbono (C), oxigênio (O) e hidrogênio (H), solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (Ran *et al.*, 2019; Andrade, 2014). Os triacilgliceróis (TAGs) são os lipídios mais abundantes nas microalgas. A depender da espécie e das condições de cultivo o teor de lipídios pode variar de 1 a 75%. Em generos *Chlorella* o teor de lipídios pode varia de 2 a 68% (Ran *et al.*, 2019; Andrade, 2014).

Os entendimentos sobre a biossíntese de tiacilgliceróis (TAG) em microalgas ainda estão



incompletos, embora recentemente as principais vias envolvidas na síntese de lipídios tenham sido parcialmente descobertas com base nos resultados da comparação do genoma e análise do transcriptoma (Kong *et al.*, 2018; LiBeisson *et al.*, 2015). A biossíntese de lipídeos podem ser divididos em duas etapas: síntese de ácido graxo e de glicerolípido.

De acordo com Ran *et al.* (2019), Costa *et al.* (2006) perfil de ácidos graxos do genero *Chlorella*, possuem predominância dos ácidos palmitoléico (C16:1) e araquídico (C20:0) além de outros ácidos graxos em menor quantidade, como ácido mirístico (C14:0); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1); ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) variando entre 0,06 e 27,08%.

De acordo com Loures (2016), a biomassa produzida a partir de microalgas pode ser convertida em biocombustíveis de diferentes maneiras, que podem ser classificadas em três subclasses: química, bioquímica e termoquímica. A seleção adequada dos métodos de conversão é determinada pela quantidade de biomassa obtida, pela forma de energia final desejada e pela viabilidade econômica.

Para Loures (2016) a transesterificação química é o método mais usado no processo de obtenção do biodiesel. A produção do biodiesel ocorre principalmente por meio da reação de transesterificação de triglicéridos. No final da reação existe duas fases líquidas distintas: uma fase inferior rica em glicerol e a fase superior que contém o éster de ácidos. Nesta reação ocorre a quebra de triglicerídeos transformando suas cadeias em estruturas mais simples com baixas viscosidades, ou seja, a molécula de álcool 3R'OH da reação desloca o glicerol do triacilglicerol resultando em éster que após a purificação é obtido o biodiesel( Ambat *et al.*, 2018; Franquitto, 2016; Andreatta *et al.*, 2010) .

Segundo Rivas *et al.* (2020), a co-cultura de microalgas-leveduras sob relação N/P controlada no meio de cultura produz distribuições de lipídios desejáveis, proporcionando melhor qualidade de biodiesel e equilíbrio entre o acúmulo de biomassa e lipídios. A partir de uma combinação baseada na superfície de resposta de  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os nutrientes aumentam os teores de biomassa e lipídios obtidos  $1,68 \text{ gL}^{-1}$  e 27,77%, respectivamente.

#### 2.4.2 Carboidratos

Carboidratos são monômeros, polímeros e derivados de açúcares (ácidos urônicos e amino açúcares). Os polímeros constituem a maior fonte de biomassa terrestre típica, desempenhando em sua maior parte função estrutural (celulose) ou de armazenamento (amido) em plantas (Gloria, 2018; Templeton *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 1998).

O cultivo com *Spirulina* sp. LEB 18, segundo Cardoso *et al.* (2020), foi realizado em efluente

da aquicultura com objetivo de produzir biomassa e macronutrientes. O experimento foi realizado em fotobiorreator (1 L) com diferentes concentrações de meio zarrouk (0, 25, 50 e 75%) e com 100% do efluente. O melhor tratamento foi o T25 (100% das águas residuais suplementadas com 25% dos nutrientes Zarrouk). A melhor condição de produção de biomassa foi reproduzida em escala piloto em um biorreator tipo canaleta (5 L). A produção de biomassa no sistema de canaleta (T25) foi maior ( $3,33 \text{ g L}^{-1}$ ) do que no controle ( $2,32 \text{ g L}^{-1}$ ) e os carboidratos (69,77%) e lipídios (12,77%) também foram maiores. O conteúdo de carotenoides em T25 foi significativo ( $9,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). *Spirulina* sp. LEB 18 removeu o fosfato (99,97%); DQO (89,34%) e nitrato (81,10%) do efluente da aquicultura. O efluente apresentou ausência de metais pesados e concentração de Al; Fe; Ca e Mg superiores à cultura controle com nutrientes Zarrouk. A *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser aplicado como agente de biorremediação de águas residuárias de aquicultura com alta produção de biomassa, carboidratos, lipídios e carotenóides.

#### 2.4.3 Proteínas

Proteínas são compostos orgânicos de alto peso molecular, formados por um ou mais polipeptídeos (20 ou mais aminoácidos ligados entre si) através de ligações peptídicas (ligação covalente entre C e N) e constituem cerca de 50 a 80% do peso seco dos microrganismos. Os aminoácidos essenciais do genero *Chlorella*, são Leucina (~4,75%), Lisina (~4,16%); Valina (~3,29%); Fenilalanina (~2,81%), Treonina (~2,40%) e Isoleucina (~2,21%), metionina (~1,13%) e triptofano (~0,46%) (Machado *et al.*, 2017),

O cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*, segundo Wang *et al.* (2019) foi realizado em efluente com alto teor de amônio e salem um fermentador semicontínuo de 5, obtiveram teores de proteína (56,70%), pigmentos totais (4,48%) e produção máxima de  $5,62 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto taxa de consumo de  $\text{NH}_4^+$  ( $1.800 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Concluíram que a microalga possui capacidade de alta conversão de amônio de águas residuais em biomassa com alta produção de proteína.

#### 2.4.4 Cinzas

A formação das cinzas e sua característica física, mineralógica e química dependem de diversos fatores, entre os quais pode-se destacar: tipo de carvão, processo de combustão (temperatura e tempo de exposição) e equipamento de controle (precipitadores eletrostáticos, filtros, ciclones). Apesar dos equipamentos de controle possuírem alta eficiência de retenção (>99,9%), seu desempenho é reduzido para partículas menores que  $10\mu\text{m}$  e, desta forma, quantidades consideráveis de cinzas podem ser emitidas à atmosfera. Estas partículas finas podem acarretar sérios problemas ao ser humano, pois permanecem por longos períodos de tempo na atmosfera, são transportadas a

centenas de quilômetros da fonte emissora e podem ser capturadas pelos alvéolos pulmonares (Duarte *et al.*, 2016; Duarte, 2015)

Segundo Duarte (2015), as cinzas leves ou volantes são partículas finas, vitrificadas e ocas; material heterogêneo constituído de fases amorfas e cristalinas. Os principais componentes das cinzas são sílica (SiO<sub>2</sub>), alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e óxido de cálcio (CaO) (Tabela 5) (Cardoso *et al.*, 2011). Outros elementos como Cd, Cu, K, Na, Ni e Mg podem ser encontrados. Muitos destes minerais são necessários para o cultivo microalgal, como: Fe, Ca, Cu, K e Mg e podem substituir parcialmente os nutrientes necessários para o crescimento microalgal (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016).

Os microrganismos possuem mecanismos que podem afetar o equilíbrio das espécies metálicas entre as fases líquida e sólida. Assim, os microrganismos podem influenciar a especiação de metais presentes nas cinzas de termelétrica, por meio de sua capacidade ativa ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização de metais. (Gadd, 2004). Entre os microrganismos que podem remover metais pesados do meio ambiente estão as bactérias, algas e fungos. A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acúmulo, podem variar amplamente, de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo com a espécie de micro-organismo (Lemos *et al.*, 2008). Wang *et al.*, (2010) estudaram a remoção de íons metálicos pela microalga *Chlorella* sp. e constaram que esta espécie de microalga foi capaz de remover íons de alumínio, cádmio, ferro, magnésio e manganês de plantas de tratamento de águas residuais. De acordo com Xu *et al.* (2019) a concentração de cinzas foi de (16,06%) após avaliar a composição de bio-óleo de *Chlorella* cultivada em água residual de esgoto e produzida por liquefação co-hidrotérmica.

Cardoso *et al.* (2020) cultivando *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando águas residuárias da aquicultura avaliou os parâmetros de crescimento da microalga, a composição bioquímica da biomassa produzida e a eficiência da *Spirulina* na remoção de nutrientes do efluente da aquicultura. Os ensaios foram realizados em fotobiorreatores fechados (1 L) usando 100% de água residual da aquicultura e suplementada com 0, 25, 50 e 75% de meio de cultura Zarrouk. As concentrações máximas de biomassa não apresentaram diferença estatística entre os ensaios 50 (1,02 g L<sup>-1</sup>), 25 (1,10 g L<sup>-1</sup>) e controle (1,05 g L<sup>-1</sup>). A biomassa do ensaio 25 apresentou as maiores concentrações de proteína (65,73%), ficocianina (16,60 mg / mL), ácido graxo poliinsaturado (38,20%) e  $\gamma$ -linolênico (23,29%). Além disso, a maior taxa de remoção de sulfato (94,01%), fosfato (93,84%), bromo (96,77%) e DQO (90,00%) foi obtida a partir do ensaio 25. O teor de cinzas produzidos para as concentrações foram 0 (12%), 25 (14%), 50 (9,6%), 75 (13%) e para o controle de 9,8%. A biomassa dos ensaios 25 e 50 apresentaram propriedades ideais para aplicação de biodiesel. A *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada usando 100% de águas residuais de aquicultura e suplementada com 25% de meio de cultura Zarrouk

foi a melhor opção para o tratamento de efluentes da aquicultura, produzindo biomassa de valor agregado e reduzindo o custo de produção.

#### 2.4.5 Clorofilas a e b

As clorofilas são pigmentos esverdeados e solúveis em gordura com um anel de porfirina. Eles são responsáveis por converter a energia solar em energia química na fotossíntese. A maioria das microalgas tem clorofila a, mas algumas podem ter clorofila b e c como *Dinophyta*. As microalgas contêm de 0,5 a 1,0% de clorofila (D'Alessandro *et al.*, 2016). Microalgas verdes como a *Chlorella* sp. são fontes primárias de produção de clorofila, denominados alimento esmeralda, devido ao seu alto teor de clorofila (Khanra *et al.*, 2018). O conteúdo de clorofila na *Chlorella* representa cerca de 7% da biomassa, cinco vezes maior que o conteúdo de clorofila na *Spirulina* (Khanra *et al.*, 2018; D'Alessandro *et al.*, 2016). Segundo Khanra *et al.* (2018) e D'Alessandro *et al.* (2016) a maior porcentagem pertencente a clorofila a e b.

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (magnésio). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Esses anéis numeram-se de 1 a 4 ou de "a" a "d", de acordo com o sistema de numeração de Fisher (Xiong *et al.*, 2019; Streit *et al.*, 2005; Schoefs, 2002). As clorofilas a e b encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila a, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) no C-3 e a clorofila b (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil-CH<sub>3</sub>. A estabilidade da clorofila b deve-se ao efeito atrativo de elétrons de seu grupo aldeído no C-3 (Streit *et al.*, 2005; Von elbe, 2000). A clorofila b é sintetizada através da oxidação do grupo metil da clorofila a para um grupo aldeído. No entanto, muitos estudos têm sido realizados para elucidar a biossíntese da clorofila b, mas as rotas para a formação da clorofila b ou das proteínas envolvidas ainda não foram elucidadas (Xiong *et al.*, 2019; Streit *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1998). A clorofila b é convertida em clorofila a através de uma enzima chamada clorofila a oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo aldeído (Xiong *et al.*, 2019; Streit *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2001). Yun *et al.* (2019) em cultivo de *Chlorella vulgaris* YH703 em concentração 200 mM de NaCl, encontrou valores de clorofila a (2,25 µg/mL), b (1,23 µg/mL) e carotenoides (0,61 µg/mL).

#### 2.4.6 Carotenoides

Os carotenoides são compostos lipofílicos de cor amarela, laranja ou vermelho, constituídos por uma cadeia principal de 40 carbonos, com oito unidades de isopreno dividindo-se em dois grupos, carotenos e xantofilas. Carotenos correspondem a carotenoides sem a adição de derivados oxigenados

e xantofilas correspondem a carotenoides com a adição de grupos-OH (por exemplo, luteína); grupos oxí (cantaxantina) ou uma combinação dos dois (astaxantina). Os carotenoides têm a capacidade de absorver luz e diminuir o excesso de energia em metabolismos fotossintéticos, sendo divididos em dois grupos, consoante a sua função, neste caso carotenoides primários e secundários (Khanra *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2017; Derner *et al.*, 2006).

Os carotenoides primários tais como  $\beta$ -caroteno e luteína são componentes funcionais e estruturais do aparato fotossintético e estão diretamente envolvidos na fotossíntese. Dessa forma, eles têm o papel de captura da luz solar, assim como proteção do sistema fotossintetizante contra a oxidação. Já os carotenoides secundários, tais como astaxantina e a cantaxantina, são sintetizados por cloroplastos, acumulados no citoplasma e não estão intrinsecamente relacionados a esse aparato estrutural e funcional. Dependendo das condições do cultivo e do ambiente, como por exemplo incidência de luz, pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, concentração de sal, esse tipo de carotenoide pode ser induzido a ter uma maior produção. Portanto, sua função é apenas a filtração da luz solar para proteção celular.

Existem uma diversidade de carotenoides produzidos por microlagas, como luteína, astaxantina, cantaxantina e  $\beta$ -caroteno. No entanto, os principais carotenoides comercializados são: luteína, astaxantina, cantaxantina e  $\beta$ -caroteno, dentre estes o género *Chlorella* possui grandes concentrações de luteína, cantaxantina e astaxantina (Khanra *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2017; Derner *et al.*, 2006).

Segundo Liu *et al.* (2017), a produção de lipídios e astaxantina, produzido por *Chlorella zofingiensis* foi investigada em diferentes condições de cultivo. A análise comparativa revelou uma boa correlação entre o acúmulo de triacilglicerol (TAG) e astaxantina em *C. Zofingiensis* sob condições de estresse. Os maiores teores de TAG e astaxantina alcançados foram 387 e 4,89 mg g<sup>-1</sup> de peso seco, respectivamente. Uma estratégia de cultura semicontínua foi desenvolvida para otimizar as produtividades de TAG e astaxantina, que alcançaram 297 e 3,3 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, o acúmulo de astaxantina foi aumentado pela inibição da biossíntese de ácido graxo.

## 2.5 Bicombustíveis

As energias renováveis são considerados um dos substitutos potenciais para os combustíveis fósseis convencionais. Bicombustíveis são produzidos a partir de materiais biológicos ou orgânicos em estado sólido, fluido ou vapor, feitos de biomassas que podem ser cultivadas e colhidas de várias fontes biológicas (Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018). São amplamente classificados por gerações como o 1G (1ª geração) provenientes de culturas alimentares cultivadas em terras agrícolas,

ou seja, produção de etanol a partir de açúcares ou amidos (cana, beterraba, milho, trigo, mandioca e outras fontes vegetais) e biodiesel a partir de óleos vegetais ou gordura animal (soja, mamona, dendê, sebo, óleo de fritura) (Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018).

Os biocombustíveis de 1ª geração (1G) provocam preocupações financeiras, naturais e políticas significativas. Visto que a fabricação em grande escala de matéria-prima requer mais terras agrícolas aráveis, resultando em terrenos reduzidos para a produção de alimentos humanos e animais. Além disso, o procedimento de produção de matéria-prima de biomassa 1G também é responsável pela degradação ecológica, tornando as culturas inviáveis (Ganesan *et al.*, 2020; Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2013).

Os biocombustíveis de 2ª geração (2G), são provenientes de diferentes itens não alimentares, como biomassa celulósica, partes não comestíveis de plantas, palha, esterco, óleo de cozinha usado, madeira e serragem para o lixo. No entanto, a produção de biocombustíveis a partir de fontes de biomassa 2G não é industrialmente lucrativa, porque o procedimento de produção requer inovações modernas e caras (Ganesan *et al.*, 2020; Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2013). Diante disso, biomassas de 3ª geração (3G) produzidas a partir de microalgas, são alternativas para a produção de biocombustíveis, as microalgas podem fornecer alguns tipos distintos de biocombustíveis sustentáveis, incluindo bioetanol e biodiesel (Ganesan *et al.*, 2020; Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2013).

Existem várias vantagens favoráveis para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, pois eles podem fornecer até 20 vezes mais bio-óleo do que a cultura tradicional. O ciclo de colheita de microalgas é curto e a taxa de crescimento é alta, além disso, não há necessidade de terra agrária de alta qualidade. A taxa atual de produção de bio-óleo de microalgas é de 10.000 litros / hectare / ano, que é muito mais alta do que outras fontes de biocombustível, como soja, girassol, canola, jathopha e palma (Ganesan *et al.*, 2020; Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2013).

Segundo Cardoso *et al.*, (2020) avaliando o reaproveitamento e tratamento de águas residuárias da aquicultura por *Spirulina* sp. LEB 18 em fotobiorreator fechados (1 L) usando 100% de águas residuais da aquicultura (T-0) e suplementado com 25 (T-25), 50 (T-50) e 75% (T-75) de meio de cultura Zarrouk. A biomassa do ensaio T-25 apresentou as maiores concentrações de proteína (65,73%), ficocianina (16,60 mg / mL), ácido graxo poliinsaturado (38,20%) e  $\gamma$ -linolênico (23,29%). Além disso, os ensaios T-25 e T-50 apresentaram propriedades ideais para aplicação de biodiesel.

Tripathi *et al.* (2015) cultivando *Scenedesmus* sp. ISTGA1 em meio BG-11 suplementado com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) como fonte de carbono, avaliou o sequestro de carbono e capacidade de produção de biodiesel. O teor de lipídios foi de 301 mg/L, quando transesterificados e analisados

via GC-MS, apresentaram 33-35,8% de ácidos graxos saturados e 54-55% de insaturados. O perfil de ácidos graxos presentes eram C16 ou C18 (> 80%), apropriados para a produção de biodiesel.

Atualmente, um número significativo de produtos agrícolas, incluindo safras, frutas e vegetais como canola, milho, mamão, algodão, soja e beterraba açucareira estão sendo produzidos em massa usando a tecnologia de organismos geneticamente modificados (OGM). Da mesma forma, a tecnologia de OGM também pode ser aplicada a microalgas para aumentar a produtividade de lipídios. Alguns estudos mostraram que poucas espécies de microalgas podem ser geneticamente modificadas para aumentar a produtividade de lipídios (óleo) da biomassa (Ganesan *et al.*, 2020; Chowdhury *et al.*, 2019; Enamala *et al.*, 2018). Segundo Lu *et al.* (2017) mais de 100 espécies de microalgas geneticamente modificadas foram catalogadas na literatura. Essas microalgas foram modificadas através da engenharia genética, que possibilitou identificar e manipular os genes de interesse com o objetivo de aumentar a síntese de determinadas biomoléculas.

## 2.6 Biorremediação

As águas residuais (domésticas, industriais, de origem petrolífera) possuem uma grande diversidade de elementos químicos. Segundo Kumar *et al.* (2015), algumas alternativas para a biorremediação dos efluentes são: precipitação química, oxidação ou redução química, ozonização, filtração, cloração, coagulação, troca iônica, osmose reversa, extração de solvente, recuperação por evaporação, cimentação, adsorção, eletrodeposição, osmose reversa e eletrodialise entre outros.

Essa intervenção na maioria das vezes mostra-se eficiente, no entanto, quando a concentração de elementos químicos está na faixa de 1–100 mgL<sup>-1</sup> o tratamento se torna ineficiente (Nagarajan *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2015; Noie *et al.*, 1992). Na Tabela 5 são apresentados as principais vantagens e desvantagens dos métodos utilizados para biorremediação de águas residuais.

**Tabela 5** - Vantagens e desvantagens de alguns processos de biorremediação.

Processo	Mecanismos de ação	Vantagens	Desvantagens
<b>Precipitação química</b>	Uma substância solúvel é convertida em outra insolúvel por reação química ou por mudanças na composição do solvente. Como ocorre na remoção de fosfatos e outros sais pela adição de coagulantes contendo ferro e/ou alumínio.	Simplex Baixo custo	Não efetiva para concentrações elevadas Difícil separação Pouco efetiva Produz lamas
<b>Oxidação e redução biológica</b>	Redução e/ou oxidação de matéria orgânica por meio da aplicação de consórcio de microrganismos.	Baixo custo	Quando sistemas biológicos são aplicados, a taxa de

			conversão é lenta e dependente das condições climáticas
<b>Oxidação e redução química</b>	Aplicação de oxidantes químicos como H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> , Cl <sub>2</sub> , ClO <sub>2</sub> e KMnO <sub>4</sub> . Utilizado na oxidação e redução de metais, bem como na desinfecção e remoção de odor da água.	Mineralização	Requer agentes químicos
<b>Tratamento eletroquímico</b>	Imposição de uma diferença de potencial e/ou corrente elétrica a um sistema composto de cátodo, anodo e eletrólito. Pode promover destruição anódica do cianeto, ao mesmo tempo que promove remoção catódica dos metais pesados.	Recuperação do metal	Aplicado para altas concentrações Custo elevado
<b>Osmose reversa</b>	Uma fonte de pressão externa é aplicada, fazendo com que a água, por meio de uma membrana semipermeável, se encaminhe da solução mais concentrada para a mais diluída.	Efluente puro	Altas pressões necessárias Custo elevado
<b>Troca iônica</b>	Resinas de troca iônica são aplicadas, podendo liberar íons sódio ou hidrogênio (resinas catiônicas) bem como hidroxila (resinas aniônicas) e apreender cátions e ânions, respectivamente.	Efetivo Recuperação do metal	Sensível a presença de partículas Resinas de elevado custo
<b>Adsorção</b>	Adsorção com carvão ativado, zeólitas, biomassa, resina polimérica, e oxi-hidróxido metálico	Adsorventes convencionais	Não efetivo para alguns metais
<b>Evaporação</b>	Separação da água dos demais compostos presentes na mesma por meio da passagem da água do estado líquido para estado gasoso.	Efluente puro	Custo elevado Produz lamas

Fonte: Dias *et al.*, 2019

A opção pelos métodos descritos em sua maioria geram resíduos, portanto, vale salientar a necessidade de optar por métodos que gerem pouco resíduo, sejam práticos e ambientalmente corretos. Pode-se justificar tal fato, a utilização de microalgas como alternativa na remoção de compostos químicos, pois utilizam compostos como nitrogênio, fósforo e carbono como nutrientes essenciais ao seu metabolismo (Nagarajan *et al.* 2020; Kumar *et al.* 2015; Noie *et al.*, 1992).

Algumas espécies de microalgas crescem em ambientes diversificados, demonstrando a possibilidade do cultivo em escala industrial. Desta forma, o tratamento através de sistema abertos ou



fechados (fotobiorreatores) são possibilidades que devem ser analisadas (Osundeko *et al.*, 2010). O tratamento via fotobiorreator é o mais utilizado permitindo o controle de parâmetros físicos - químicos, além do acompanhamento da produção da biomassa. Esse sistema permite uma remoção concreta de poluentes, em especial o CO<sub>2</sub> (Xiong *et al.*, 2017; Chiu *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2009).

A possibilidade de biorremediar efluentes a partir de microalgas é promissora, como apresentado na Tabela 6. Um efluente rico CO<sub>2</sub>, fósforo e nitrogênio permitem uma alta taxa de produção de microalgas. Diante dessas condições, é possível obter uma diminuição nos custos de produção, redução dos níveis de nutrientes e produção de biomoléculas. (Xiong *et al.*, 2017; Fazal *et al.*, 2017; Christenson e Sims, 2011; Brennan e Owende, 2010). Apesar destas vantagens a implementação de um sistema em escala industrial é oneroso, o tempo de crescimento dos microrganismos é longo, a concentração da biomassa pode ser baixa e requer um controle do sistema físico- químico (Xiong *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2011; Ruiz-Marin *et al.*, 2010; Noie *et al.*, 1992). Portanto, torna-se necessários maiores investigações, para tornar os processos cada vez mais eficientes e passíveis de escalonamento.

**Tabela 6** -Potencial biorremediador de espécies de microalgas sobre diversos compostos. Fonte: Dias *et al.*, 2019.

Espécie	Composto(s) remediado(s)	Remoção (%)	Referência
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Fósforo inorgânico, Nitrogênio amoniacal, Fósforo inorgânico e Nitrogênio amoniacal	84; 49; 80-88 e 64-82	Slompo, 2018
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Oxitetraciclina	97	Santaefemia <i>et al.</i> , 2016
<i>Chlorellavulgaris</i>	Nitratos e Fosfatos	72,40 e 76,13	Pimenta, 2012
<i>Chlorella sp.</i>	Cádmio	48,7	Matsunaga <i>et al.</i> , 1999
<i>Chlorellasp.</i>	Dióxido de carbono, Óxido de nitrogênio e Dióxido de enxofre	60; 70 e 50	Chiu <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorellavulgaris</i>	Nitrogênio e Fósforo	≅ 100 e ≅ 100	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016
<i>Synechocystis salina</i>			
<i>Microcystisaeruginosa</i>			
<i>Scenedesmus sp.</i>	Amônia, Nitrato, Fosfato e Oxigênio químico	70-98	Nayak <i>et al.</i> , 2016
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Amônia e Fosfato	>97 e >97	Oliveira <i>et al.</i> , 2016
<i>Chlamydomonas biconvexa</i>	Nitrogênio e Fósforo	≥60; ≥90	Nascimento, 2016
<i>Tetranephris sp.</i>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nitrogênio, Fósforo e Zinco	90,6; 98,7 e 85,4	Santos, 2017
<i>Spirulina platensis</i>	Cobre e Zinco	99 e 95	Reck <i>et al.</i> , 2018
<i>Spirulina platensis</i>	Cromo (VI)	62	Dal Magro <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	Amônia, Fósforo, Ferro, Manganês, Cobre e Zinco	82,2; 51,9; 88,2; 79,5; 58,2 e 60,9	Silva, 2006

### 2.6.1 Água Produzida

Na indústria de óleo e gás, a água produzida é um termo usado para designar a água associada ao petróleo durante o processo de extração. A água produzida resulta de dois processos na indústria de óleo e gás. Primeiro, durante a extração, isso origina uma mistura de água e óleo. Em segundo lugar, a água injetada no campo petrolífero, com o objetivo de trazer o petróleo profundo para a superfície, também se torna parte da água produzida ou das águas residuais. Com base na origem, a água produzida pode ser classificada como água produzida a partir de gás natural, campo petrolífero ou metano de leito de carvão (Ahmad *et al.*, 2019; Al-Ghoutiet *al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018).

A água produzida possui uma composição complexa e variável, suas propriedades físicas e químicas dependem da localização geográfica do campo, formação geológica, método de extração e tipo de produto de hidrocarboneto que está sendo produzido. O efluente contém algumas das características químicas do hidrocarboneto com o qual está em contato há séculos. Suas propriedades e volume podem até variar ao longo da vida de um reservatório. A água produzida de plataformas de gás, são cerca de 10 vezes mais tóxicas do que as produzidas em poços de petróleo, mas, os volumes de produção de gás são muito menores (Ahmad *et al.*, 2019; Al-Ghouti *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018)

Os principais grupos constituintes da água produzida são Sódio (Na), cloro (Cl), bário (Ba), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), cálcio (Ca), potássio (K), sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), ferro (Fe), alumínio (Al), cromo (Cr), manganês (Mn), titânio (Ti), zinco (Zn), arsênio (As), chumbo (Pb), sais (expressos como salinidade, sólidos totais dissolvidos (TDS) ou condutividade elétrica), óleo e graxa (O&G), BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). PAHs (hidrocarbonetos poliaromáticos), ácidos orgânicos, fenol, alguns compostos naturais inorgânicos e orgânicos (cálcio, magnésio, sulfatos e bário), aditivos químicos usados na perfuração, fraturamento e operação, isso pode ter algumas propriedades tóxicas (por exemplo, biocidas e inibidores de corrosão) (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018).

A água produzida contém vários contaminantes diferentes com concentrações variadas, portanto, inúmeras tecnologias de tratamento têm sido propostas para o tratamento da água produzida. O sistema de tratamento geralmente requer uma série de processos unitários individuais para a remoção de contaminantes que podem não ser removidos por meio de um único processo. O tratamento da água produzida pode ajudar a facilitar seu reúso para fins agrícolas e industriais (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018).

O tratamento da água produzida deve ser capaz de remover óleos e graxas, compostos orgânicos, sólidos suspensos, gases dissolvidos, materiais radioativos naturais, sais e microrganismos.

De acordo com Al-Ghouti, *et al.* (2019) e Fakhru'l-Razi *et al.* (2009), a combinação de processos de tratamento físico, químico e biológico deve ser usada para atingir os diferentes objetivos do tratamento. Os tratamento mais usados atualmente para tratar água produzida são filtração eletrodialise, flotação, adsorção, precipitação e oxidação química.

#### 2.6.1.1 Filtração

A filtração é uma técnica relativamente simples usada no processo de tratamento de água e esgoto, que se baseia no uso de meios filtrantes porosos para permitir que apenas a água, mas não as impurezas, passem por ela. Existem vários materiais porosos que podem ser usados como meio de filtro, como areia, pedra britada e carvão ativado. Porém, o material mais utilizado é a areia devido à sua disponibilidade, baixo custo e eficiência (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018).

#### 2.6.1.2 Eletrodialise

Eletrodialise (ED) e reversão de eletrodialise (EDR) são processos de separação acionados por carga eletroquímica e são usados para o tratamento de água salobra, dessalinização de água do mar e recuperação de águas residuais, além de serem testados para o tratamento de água produzida em escala laboratório (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019). Os sais são removidos através de uma coluna de membranas seletivas de ânions e cátions que são separadas por espaços entre as membranas, em seguida a corrente elétrica promovendo a remoção do sal através da migração de ânions e cátions em direções opostas (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018).

#### 2.6.1.3 Flotação

Neste método, bolhas finas de gás são utilizadas para a separação de partículas suspensas que não podem ser removidas por sedimentação (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019). Este processo é feito injetando gás na água que provoca a suspensão das gotículas de óleo e consequente fixação do óleo nas bolhas de ar, e são removidas por escumação (Al-Ghouti, *et al.*, 2019). Este processo pode ser feito usando ar, nitrogênio ou outros tipos de gases inertes. A técnica pode ser usada para a remoção de orgânicos voláteis, óleo e graxa da água produzida (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019).

#### 2.6.1.4 Adsorção

A adsorção é considerada uma das melhores técnicas de tratamento para se obter uma melhor qualidade da água, pois pode reduzir a concentração do contaminante a níveis muito baixos. Através

deste tratamento quase 100% da recuperação da água produzida e 85% da remoção dos metais pesados pode ser realizada através do processo de adsorção. Porém, a principal desvantagem da utilização do método de adsorção é o custo de instalação e manutenção do sistema, mas esta desvantagem pode ser contornada com o uso de meios de adsorção mais econômicos, como carvão ativado, que podem tornar o processo de adsorção mais competitivo. Além disso, diferentes compostos orgânicos e inorgânicos como manganês, ferro, COT, BTEX, óleo e metais pesados podem ser retidos por vários materiais adsorventes (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2018).

#### 2.6.1.5 Precipitação

A precipitação é considerada um dos processos convencionais de tratamento químico da água produzida. Por meio desse processo, pode-se realizar a remoção de até 97% das partículas suspensas e coloidais. Floculantes e coagulantes que são compostos principalmente de metais inorgânicos, como ferro, magnésio e polímeros de alumínio, são normalmente usados no processo de tratamento químico e foram considerados eficazes na remoção de contaminantes (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2018).

#### 2.6.1.6 Oxidação química

Esta tecnologia é geralmente usada para a remoção de DQO e DBO, odor, cor, compostos orgânicos e alguns inorgânicos da água produzida. Para eficiência dessa tecnologia os elétrons livres devem ser removidos, pois, esse processo de tratamento depende das reações de oxidação e redução (Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2018). Geralmente, vários poluentes podem ser decompostos usando vários oxidantes como cloro, ozônio, peróxido e oxigênio. Além disso, existem vários parâmetros que afetam a taxa de oxidação dessa tecnologia, incluindo: dose do produto químico, tipo de oxidante usado, qualidade da água bruta e tempo de contato entre a água e o oxidante usado. As principais vantagens deste processo de tratamento são; exigência mínima de equipamento, não gera resíduos, não necessita de nenhum processo de pré-tratamento e pode atingir quase 100% de recuperação de água. No entanto, as principais desvantagens são; tem alto custo químico, manutenção e calibração da bomba química (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2018).

#### 2.6.1.7 Processo de tratamento baseado em microalgas

Atualmente, o conceito de Eco-tecnologia destinado ao tratamento de águas produzida, destina abordagens destinadas a alcançar altas taxas de remoção de poluentes (Ahmad *et al.*, 2020; Al-Ghouti,

*et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2018). Portanto, o uso de tratamento à base de microalgas dispõe como uma solução sustentável, para o processo de tratamento definido e orientado pelas abordagens de Eco-tecnologia (Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019). Geralmente, a bioremediação de efluentes de água produzida, pode ser feita através do uso de microalgas devido à capacidade deste organismo utilizar certos poluentes como fonte de nutrientes. De acordo com um estudo conduzido por Takacova *et al.* (2015), o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) podem ser utilizados como única fonte de carbono, por espécies de microalgas específicas, como *Chlorella kessler*.

De acordo com um estudo feito por Takacova *et al.* (2015), em espécies de microalgas específicas, como *Parachlorella kessler* o BTEX pode ser utilizado como uma única fonte de carbono. Em outro estudo a fração solúvel da gasolina em água, foi utilizada para compreender o efeito do BTEX no crescimento de microalgas, bem como avaliar sua toxicidade. Observou-se que com o aumento da concentração de BTEX e o tempo de contato da microalga com a fração solúvel, percebeu-se uma inibição de 50% do crescimento.

As altas concentrações de hidrocarbonetos na água produzida, provoca uma maior toxicidade no crescimento das microalgas. Segundo Fakhru'l-Raziet *al.* (2009) a água produzida pode conter altas concentrações de nitrogênio e fósforo, que apesar de fazerem parte do metabolismo microalgal, quando em excesso, podem agir como fatores de limitação de crescimento para microalgas. Além disso, existem vários oligoelementos além de nitrogênio e fósforo, que são importantes para o crescimento de microalgas e também estão presentes na água produzida. Assim, o cultivo de microalgas na água produzida tem potencial biorremediador. Além disso, a biomassa de microalgas cultivadas pode ser usada como matéria-prima alternativa para geração de energia e biomoléculas. As cepas de microalgas usadas em diferentes tratamentos de água para bioremediação de poluentes incluem *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. (Al-Ghouti, *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2018).

Ammar *et al.* (2018) avaliou *Isochrysis galbana* cultivada em meio BG11 suplementado com 0,10,25 e 50% de água produzida. E demonstrou que a produção de biomassa foi (1,123; 1,0166; 0,856 e 0,31 gL<sup>-1</sup>) *Nannochloropsis oculata* (1,01; 0,899; 0,638 e 0,314 gL<sup>-1</sup>), respectivamente. Os resultados mostraram que ambas as linhagens podem sobreviver e crescer eficientemente em água produzida, quando uma adaptação sucessiva adequada é fornecida. Em geral, *Nannochloropsis oculata* apresentou melhores propriedades de crescimento e adaptação do que *Isochrysis galbana* na presença de água produzida.

De acordo Jaén-Gil *et al.* (2020) foram testadas o cultivo de oito cepas (*Rhodomonas salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Emiliania huxleyi*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis*

*suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricorutum*) de microalgas em água do mar e água produzida, durante 14 dias (com aumento de 5 mg/L). Das oito cepas de microalgas selecionadas, *Tetraselmis suecica* apresentou as maiores taxas de remoção de surfactante do cloreto de benzalcônio, em cerca de 100% na água do mar e 54% na água produzida. Neste estudo, *Tetraselmis suecica* foi classificada como a espécie de maior sucesso em reduzir a atividade surfactante do cloreto de benzalcônio.

*Chlorella vulgaris* foi cultivada meio padrão derivado de microbiologia (MLA), suplementado com três diferentes águas residuais (águas residuais primárias (PWW), águas residuais secundárias (SWW), efluentes de petróleo (PE)) em diferentes proporções (0 a 100%). Foram avaliados a eficiência de remoção de nitrogênio total (TN), fósforo total (TP), concentração e taxa de crescimento da microalga. Ao longo de um período de 13 dias, *Chlorella vulgaris* obteve concentração de biomassa (1,6 g L<sup>-1</sup>), taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) (1.209 d<sup>-1</sup>), e remoção de 80% e 100% de TN e TP, respectivamente em efluente PWW. Na mistura desta água com MLA, a taxa de crescimento ( $\mu$ ) (0,75 d<sup>-1</sup>) diminuiu progressivamente na mistura de 75% (MLA) e 25% (PWW). Na proporção 25:75, a taxa de crescimento ( $\mu$ ) foi de 0,54 d<sup>-1</sup>, e a eficiência de remoção de TN diminuiu de 85% para 76%. A remoção de 100% de TP foi registrada para todas as amostras. Para SWW e PE a remoção de nutrientes em massa de 79–83% TN foi registrada, com valores correspondentes de concentração e taxa de crescimento ( $\mu$ ) de 1,16 - 0,69 g L<sup>-1</sup> e 0,62-0,31 d<sup>-1</sup> respectivamente (Znad *et al.*, 2018).

## 2.7 Considerações finais

A alguns anos as microalgas tem ganhado notoriedade no mercado mundial, devido ao seu crescimento rápido, cultivo simples e pela versatilidade de serem utilizadas em vários campos da indústria desde a simples produção de biomassa, por exemplo para a produção de rações, à obtenção de biomoléculas de elevado valor comercial (proteínas, lipídios, antioxidantes), e ainda de matérias-primas para a produção de biocombustíveis, podendo neste campo resolver dois dos aspectos negativos da indústria dos biocombustíveis – a utilização de culturas de alimentação humana ou animal, e a ocupação de solos aráveis pelas culturas energéticas.

Além disso, o crescente interesse em tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas, na obtenção de produtos para o consumo humano, demanda uma contínua busca por espécies e/ou variedades capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos e de como é possível potencializar a biossíntese (condições de cultivo, melhoramento genético). Igualmente, há a necessidade de pesquisas visando o desenvolvimento, utilização de efluentes e, principalmente, ao aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala industrial, a fim de

tornar comercialmente viáveis alguns dos sistemas conhecidos. Essas pesquisas, por fim, também, se fazem necessárias à identificação dos produtos que podem ser extraídos das microalgas, da possível atividade biológica (estudos genéticos e toxicológicos), dos processos de biorremediação e do desenvolvimento de mercados específicos para estes.

A biorremediação de águas residuais através de microalgas já é uma realidade. Diversos estudos mostram que as microalgas são uma excelente alternativa para a remoção de nitrogênio e fósforo no tratamento de efluentes, com destaque para espécie *Chlorella Vulgaris*. Diante disso, microalgas se aproveitam desses compostos para sua nutrição, desencadeando uma “colaboração” entre microalga e efluente.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. A., Goh, P. S., YOGARATHINAM, L. T., & ZULHAIRUN, A. K. Current advances in membrane technologies for produced water desalination. *Desalination*, v.493, p.114643, 202.
- AMMAR, Saad H.; KHADIM, Hussein J.; MOHAMED, Ahmed Isam. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 10, p. 132–142, 2018.
- ANDRADE, Diva Souza; COLOZZI, Arnaldo Filho; *Microalgas de águas continentais*. Instituto Agrônomo do Paraná. Londrina, 2014
- ANDRADE, Lidiane maria de. *Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas*. 2014. 141f. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.
- ARASHIRO, Larissa T.; BOTO-ORDÓÑEZ, María; VAN HULLE, Stijn W.H. Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 303, p. 122894, 2020.
- BARBOSA, V. *Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil*. 2012.171f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- BECKER, E.W. Oil production. In: *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Ed. Baddiley, J. et

al., Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York. 1994.

BEE, Laura. L; BOYD, Eric. S; PETERS, John. W; POSEWITZ, Matthew C. .Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 20, n.3 p.264-271,2009

BJERK, T. Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental)- Departamento de Química Industrial -, Universidade de Santa Cruz, Rio Grande do Sul, 2012.

BERNAERTS, Tom M.M.; GHEYSEN, Lore; FOUBERT, Imogen; *et al.* The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 8, p. 107419, 2019.

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

BRAGA, Vagner da Silva. Produção de macromoléculas no cultivo de *Spirulina e Chlorella* com CO<sub>2</sub>, cinzas e redução da fonte de nitrogênio. 2018. 137f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae.A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010

CAI, T; PARK S.Y; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects, *Renew. Sustian. Energy Rev.* v.19, p.360–369, 2013

CANELLI, Greta; NEUTSCH, Lukas; CARPINE, Roberta; *Chlorella vulgaris* in a heterotrophic bioprocess: Study of the lipid bioaccessibility and oxidative stability. *Algal Research*, v. 45, p. 101754, 2020.

CARDOSO, A. M.; TONIOLO, R.; PIRES, M. FERRET, L. Síntese de zeólitas a partir de cinzas de carvão visando uma produção mais limpa e econômica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CARVÃO MINERAL, 09, 2011, Porto Alegre. Anais do III Congresso Brasileiro de Carvão Mineral.



Porto Alegre: REDE CARVÃO, 2011.

CARDOSO, Lucas Guimarães; DUARTE, Jessica Hartwig; ANDRADE, Bianca Bomfim. Spirulina sp. LEB 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: High biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. *Aquaculture*, v. 525, p. 735272, 2020.

CARDOSO, Lucas Guimarães; DUARTE, Jessica Hartwig; COSTA, Jorge Alberto Vieira; Spirulina sp. as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel. *BioEnergy Research*, 2020.

CARVALHO, A; MEIRELES, L.; MALCATA, F. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, v. 22, n. 6, p. 1490–506, 2006.

CHACON-LEE, T. L.; GONZALEZ-MARINE, G. E. Microalgae for “ Healthy ” Foods — Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 655-675, 2010.

CHEN, C.Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H.W.; HO, S.H.; CHENG, C.L.; LEE, D.J.; BAI, F.W.; CHANG, J.S. Microalgae-based carbohydrates for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*. v.78, p.1-10, 2013.

CHEN, G., CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters*, v.28, p.607-616, 2006.

CHINNASAMY, S., RAMAKRISHNAN, B., BHATNAGAR, A., DAS, K. C. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO<sub>2</sub> and Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*. p. 518-532, 2009.

CHIU, S.-Y. et al. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource technology*, v. 99, n. 9, p. 3389-96, 2008

CHIU, S.-Y. et al. The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 3, p. 254-260, 2009

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

CHRISTENSON, L. e SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, 2011.

COSTA, J. A., RADMANN, E. M., CERQUEIRA, V. S., dos SANTOS, G. C., CALHEIROS, M. N. Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella Minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição*, p. 429-436, 2006.

D’ALESSANDRO, Emmanuel B.; ANTONIOSI FILHO, Nelson R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 58, p. 832–841, 2016.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3473-3480, 2011.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v.36, n.6, p. 1959-1967, 2006.

DERNER, R. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos polinsaturados. 2006,158f. Tese 103 (Doutorado em ciência dos alimentos)- Departamento de ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DIAS, Guilherme; HIPÓLITO, Matheus; SANTOS, Fernando; *et al.* Biorremediação de efluentes por meio da aplicação de microalgas – uma revisão. *Química Nova*. 42, n. 8, p. 891-899, 2019

DUARTE, J. H. Utilização de efluentes gasosos e resíduo sólido de termolétrica à carvão nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivations. *Bioresource Technology*, v. 214, p. 159-165, 2016.

ELRAYIES, G. M. (2018). Microalgae: Prospects for greener future buildings. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 81 p. 1175–1191, 2018

ENAMALA, Manoj Kumar; ENAMALA, Swapnika; CHAVALI, Murthy; *et al.* Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 94, p. 49–68, 2018.

FAKHRU'L-RAZI, Ahmadun; PENDASHTEH, Alireza; ABDULLAH, LuqmanChuah; *et al.* Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170, n. 2–3, p. 530–551, 2009.

FAZAL, Tahir .MUSHTAQ ,Azeem; REHMAN ,Fahad; KHANA, Asad Ullah; RASHIDB, Naim , FAROOQ , Wasif; REHMANA, Saifur Muhammad; XUD, Jian . Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Review*. v. 82, p.3107-3126, 2018

FERRO, Lorenza; HU, Yue O.O.; GENTILI, Francesco G.; *et al.* DNA metabarcoding reveals microbial community dynamics in a microalgae-based municipal wastewater treatment open photobioreactor. *Algal Research*, v. 51, p. 102043, 2020.

FRANCO, André Luiz Custódio; LÔBO, Ivon Pinheiro; CRUZ, Rosenira Serpa da; TEIXEIRA,Cláudia Maria Luz Lapa; NETO, José Adolfo de Almeida; MENEZES, Rafael Silva. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, v. 122, p. 109-119, 2004.

GANESAN, Ramya; MANIGANDAN, S.; SAMUEL, Melvin S.; *et al.* A review on prospective production of biofuel from microalgae. *BiotechnologyReports*, v. 27, p. e00509, 2020.

GLÓRIA, Patrícia Cunha da. Produção de biocombustíveis usando hidratos de carbono de microalgas. 2018. 63f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade do Algarve, Portugal, 2018

GOUVEIA, L., OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 269-274, 2009.

GROBBELAAR, J. U. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us? *Journal of Applied Phycology* v. 19, p.591-598, 2007

HUNTLEY, M.E.; REDALJE, D.G. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v.12, n. 4, p.573–608, 2007.

HOEK, Christiaan; VAN DEN, Hoek C; MANN, David; JAHNS, H. M; JAHNS, Martin. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, 1995

JAÉN-GIL, Adrián; FERRANDO-CLIMENT, Laura; FERRER, Imma; *et al.* Sustainable microalgae-based technology for biotransformation of benzalkonium chloride in oil and gas produced water: A laboratory-scale study. *Science of The Total Environment*, v. 748, p. 141526, 2020.

JIMENEZ, S; MICO, M.M; ARNALDOS, M; MEDINA, F; CONTRERAS S. State of the art of produced water treatment. *Chemosphere*. v.192, p. 186-208, 2018

KHANRA, Saumyakanti; MONDAL, Madhumanti; HALDER, Gopinath. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioproducts Processing*, v. 110, p. 60–84, 2018.

KLIN, Marek; PNIEWSKI, Filip; LATAŁA, Adam. Composição bioquímica dependente da fase de crescimento de microalgas verdes: considerações teóricas para a produção de biogás. *Tecnologia Bioresource*. v.03 p. 122875, 2020

KONG, Fantao; ROMERO, Ismael Torres; WARAKANONT, Jaruswan; LI-BEISSON, Yonghua. Lipid catabolism in microalgae. *New Phytology* v.218, n.4, p 1340-1348, 2018

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Review. Trends in Biotechnology*.. v.28, p.371- 380, 2010

KUMAR , K. Suresh; DAHMS, Hans-Uwe; WON, Eun-Ji ; LEE, Jae-Seong; SHIN, Kyung-Hoon. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V.113, p.329–352, 2015

LAM, Man Kee; YUSOFF, Mohammad Iqram; UEMURA, Yoshimitsu. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, v. 103, p. 197–207, 2017.

LEMOS, J. L. S.; CARLOS, M. C.; FARIAS, Y. P-T. M. M.; SANTOS, R. L. C. Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008, 65p.

LIBEISSON, Y; BEISSON, F; RIEKHOF, W; Metabolism of acil-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*. v.82, p.504-522, 2015

LI, Kun; LIU, Qiang; FANG, Fan; *et al.* Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, v. 291, p. 121934, 2019.

LIU, Jin; MAO, Xuemei; ZHOU, Wenguang; GUARNIERI, Michael T. Produção simultânea de triacilglicerol e carotenóides de alto valor pela microalga verde oleaginosa produtora de astaxantina *Chlorella zofingiensis*. *Tecnologia Bioresource* v.214, p. 319-32, 2016

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

MACHADO, Adriana R.; GRAÇA, Carolina S.; ASSIS, Leticia M. De; *et al.* Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. *Revista de Ciências Agrárias*, p. 264-278 Páginas, 2019.

MATA, M. T., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalage for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. p. 217-232, 2010.

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

MOONEY, W.D.; KLAMCZYNSKA, B. Heterotrophic Microalgae: A Scalable and Sustainable Protein Source. p. 327-339, 2017

NAGARAJAN, Dillirani; LEE, Duu-Jong; CHEN, Chun-Yen; CHANG, Jo-Shu. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology*. V.302, p.122817, 2020

NICCOLAI, Alberto; CHINI ZITTELLI, Graziella; RODOLFI, Liliana; *et al.* Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, v. 42, p. 101617, 2019.

NOIE, J. D.; LALIBERT, G. e PROULX, D. Algae and waste water. *Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures*. p. 247-254, 1992

OLIVEIRA, A. C.; BARATA, A.; BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* in poultry wastewater bioremediation *Environ. Technol.*v.40, p. 3735-3744, 2018

OSWALD, W. Large-scale systems (engineering aspects). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, p. 357-394, 1988.

PATEL, Alok; MATSAKAS, Leonidas; ROVA, Ulrika; *et al.* A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, v. 278, p. 424–434, 2019.

PARK, J.B.K.; CRAGGS, R.J.; SHILTON, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. 2010. *Bioresource Technology*. 2011. v.105, n.3, p.35-42.

JÁCOME-PILCO, Carlos Rodrigo; CRISTIANI-URBINA, Eliseo; LORES-COTERA, Luis Bernardo; VELASCO-GARCÍA, Roberto; PONCE-NOYOLA, Teresa; CAÑIZARES-VILLANUEVA, Rosa Olivia. Remoção contínua de Cr (VI) por *Scenedesmus incrassatulus* em um fotobiorreator de transporte aéreo. *Bioresource Technology*. v. 100, n. 8, p.388-2391, 2009

PEREZ-GARCIA, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Basahn, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. v.45, p.11- 36, 2010.

PÉREZ-LLORENS, José Lucas. Microalgae: From staple foodstuff to avant-garde cuisine. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 21, p. 100221, 2020.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P. e OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2010.

RAN, Wenyi; WANGB, Haitao; LIUC, Yinghui; QIA, Man; XIANGA, Qi; YAOA, Changhong; ZHANGA, Yongkui; LANA, Xianqiu. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology*. V.291, p.121894, 2019

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia*. p. 33-37, 2004

RICO, Ortiz. Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria. 2014. 1115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014

RIVAS, Jessica K.; HERNÁNDEZ-ALTAMIRANO, Raúl; MENA-CERVANTES, Violeta Y. 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*, v. 280, p. 118633, 2020.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* v. 102, n. 1, p. 100–120, 2008.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G. e STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource technology*, v. 101, n. 1, p. 58-64, 2010.

SHI, H. Industrial Wastewater-Types, Amounts and Effects. *Point Sources of Pollution: Local Effects and Their Control - Volume 1, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Paris, France: UNESCO, EolssPublishers. p. 191-203,2014

SILVA, Carlos Eduardo de Farias; DE OLIVEIRA CERQUEIRA, Raphaella Barbosa; DE LIMA NETO, Cantídio Francisco. Developing a kinetic model to describe wastewater treatment by microalgae based on simultaneous carbon, nitrogen and phosphorous removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 3, p. 103792, 2020.

SPOLAORE, P; JOANNIS-CASSAN, C; Duran, E; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* v.101, p.87-96. 2006

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SUN, Z.; Li, T.; ZHOU, Z.; JIANG, Y. Microalgae as a source of lutein: Chemistry, biosynthesis, and carotenogenesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2016, 153, 37–58.

TAKÁČOVÁ, A; SMOLINSKÁ, M; SEMERÁD M., MATÚŠ,P. Degradation of BTEX by microalgae *Parachlorellakessleri*, *Petrol. Coal.* v.57, p. 101–107, 2015

TEMPLETON, D. W., QUINN, M., VAN WYCHEN, S., HYMAN, D., & LAURENS, L. M. L. (2012). Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1270, 225–234.

TERRY, K.; RAYMOND, L. System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 7, n. 10, p. 474–87, 1985.

TORRES-TIJI, Yasin; FIELDS, Francis J.; MAYFIELD, Stephen P. Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*, v. 41, p. 107536, 2020.

TRIPATHI, Ritu; INDU, Jyoti Singh; THAKUR, Shekhar. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy*. v.74, p. 774-781, 2015

VARGAS, M.; RODRÍGUEZ, H.; MORENO, J.; OLIVARES, H.; DEL CAMPO, J.; RIVAS, J.;



GUERRERO, M. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of Phycology*, v. 34, p. 812–817, 1998.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V. MORAIS, M. G. Use of solid waste from thermoelectric plants for cultivation of microalgae. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, p. 1-8, 2016.

VIDOTTI, Annamaria Dória Souza. Cultivo heterotrófico axênico de *Chlorella vulgaris*: inibição por substrato. 2012. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, 2012

WANG, L.; MIN, M.; LI, Y.; CHEN, P.; CHEN, Y.; LIU, Y. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 1174–1186, 2010.

WANG, Weiliang; HAN, Feifei; LI, Yuanguang; *et al.* Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors. *Bioresource Technology*, v. 170, p. 395–403, 2014.

WANG, Qingke; YU, Zongyi; WEI, Dong. High-yield production of biomass, protein and pigments by mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* through the bioconversion of high ammonium in wastewater. *Bioresource Technology*, v. 313, p. 123499, 2020.

WEBER, D. P.; CAETANO, P.; FERNANDES, A. S.; *et al.* PERFIL DE CAROTENOIDES DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM CULTIVO FOTOTRÓFICO. *In: Blucher Chemical Engineering Proceedings*. São Carlos, SP: Editora Blucher, 2017, p. 1486–1490.

XIONG, Jiawen; YU, Linlin; ZHANG Zhibin, WANG , Ya; WANG , Weiyang; YANG, Huilin; YAN, Riming; ZHU Du. Intrinsic kinetic model of photoautotrophic microalgae based on chlorophyll fluorescence analysis. *Mathematical Biosciences*. v. 315, p. 108234, 2019

XIONG, Jiu-Qiang; KURADE, Mayur B; JEON, Byong-Hun. Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? *Trends in Biotechnology*. v. 154, p. 15, 2017

XU, Donghai; WANG, Yang; LIN, Guike; *et al.* Co-hydrothermal liquefaction of microalgae and sewage sludge in subcritical water: Ash effects on bio-oil production. *Renewable Energy*, v. 138, p. 1143–1151, 2019.

YUN, Chol-Jin; HWANG, Kum-Ok; HAN, Song-Su; *et al.* The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and Bioenergy*, v. 127, p. 105277, 2019.

ZAMALLOA; Carlos; VULSTEKE, Elien; ALBRECHT, Johan; VERSTRAETE, Willy. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Tecnologia Bioresource*. v 102, p.149-1158, 2011

ZHANG, Z., GAO, P., GUO, L., WANG, Y., SHE, Z., GAO, M., ZHAO, Y., JIN, C., WANG, G., Elucidating temperature on mixotrophic cultivation of a *Chlorella vulgaris* strain: different carbon source application and enzyme activity revelation. *Bioresource Technology*. V.314, 123721, 2020

ZHONG, Weihong; LI, Yixiao; SUN, Kedan; *et al.* Aerobic degradation of methyl tert-butyl ether in a closed symbiotic system containing a mixed culture of *Chlorella ellipsoidea* and *Methylolibiumpetroleiphilum* PM1. *Journal of Hazardous Materials*, v. 185, n. 2–3, p. 1249–1255, 2011.

Znad, H., Ketife, A. M. D. Al, Judd, S., Almomani, F., &Vuthaluru, H. B. Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, v. 110, p.1–7,2018.

## CAPÍTULO II

### Caracterização Bioquímica e Estimativa Teórica de Biocombustíveis da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em Água Produzida

Danilo Alves Silva<sup>a</sup>, Jamilla Sueira de Jesus Silva<sup>a</sup>, Lucas Guimarães Cardoso<sup>b</sup>, Janice Izabel Druzian<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

\*Autor para correspondência: Danilo Alves Silva, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil, Telefone: +55 7132836907, e-mail: [alvessilva.danilo@gmail.com](mailto:alvessilva.danilo@gmail.com)

### RESUMO

O objetivo foi caracterizar a biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada com suplementação diária de água produzida, visando além do conhecido caráter biorremediador da espécie microalgal, verificar a produção de biomoléculas de interesse comercial. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* contendo 1,5 L de meio BG11, submetido ao tratamento AP (suplementação diária com 50 mL de água produzida não autoclavada) e AD (suplementação diária com 50 mL de água destilada) durante 26 d. A produção de biomassa foi 4,87; 1,69 e 1,95 gL<sup>-1</sup> no tratamento controle, AP e AD, respectivamente. AP apresentou maior teor de carboidratos (40,19%), em relação ao controle (17,00%) e AD (22,50%). Os valores de clorofila a e b para AP variaram de 0,65 e 0,42 µg/mL<sup>-1</sup> e carotenóides 2,4 µg/mL<sup>-1</sup>, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao Controle (1,20 (a), 0,80 (b) e 3,40 µg/mL<sup>-1</sup> carotenóides), e AD (0,30 (a), 0,20 (b) e 0,90 µg/mL<sup>-1</sup> carotenóides). O teor de lipídios de AD (24,08%) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparado a AP (21,53%) e controle (21,37%). A produção de bioetanol em AP (18,22 mL/100g de biomassa) foi maior quando comparado a AD (10,20 mL/100g de biomassa) e ao controle (7,70 mL/100g de biomassa). O perfil de ácidos graxos de AP foi majoritariamente composto de monoinsaturados (48,52%), enquanto AD (49,71%) e controle (50,23%) saturados. AP apresentou maior teor de ácido palmitoleico (5,42 mg·g<sup>-1</sup>); γ-linolênico (3,02 mg·g<sup>-1</sup>) e linolelaídico (1,94 mg·g<sup>-1</sup>). Quanto as propriedades de biodiesel, AP apresentou número de cetano (49,22%) e valor de iodo (101,32 g iodo/100g) de acordo as normas. Os níveis de saponificação 211,97 comparados a biocombustíveis de 1ª geração, apenas o ponto de entupimento, foi ligeiramente superior (22,48°C) ao preconizado pela legislação. Aliando estes resultados a alta eficiência de remoção de metais pesados como Cobre (Cu), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Zinco (Zn) e Ferro (Fe) que obtiveram eficiência de remoção de 70,00; 76,89; 97,82; 96,55 e 90,74 % respectivamente, e remoção de hidrocarbonetos totais (HTP) de 48,59 %. Portanto, a biomassa de AP, é uma alternativa promissora para biorremediar compostos químicos, além de ser substrato para a produção de biocombustíveis utilizando água residual da indústria petrolífera.

**Palavras chaves:** Biocombustíveis, composição centesimal, pigmentos, ácidos graxos, microalgas, biorremediação.

## 1. Introdução

O crescimento populacional e as mudanças climáticas ameaçam recursos naturais, como energia, alimentos e água (Duarte *et al.*, 2019). Estima-se que no período de 2013 a 2017 no Brasil foram produzidos,  $7468.10^9$  m<sup>3</sup> de água residual (FAO/Aquastat – 2017). Dentre as águas residuais, está a água produzida (AP) obtida pela extração de petróleo, naturalmente presente em rochas sedimentares, originada pela emersão da água após sua injeção no poço de petróleo (Gondim *et al.*, 2017). A quantidade de AP varia conforme idade do poço, onde 5 a 15% em volume é produzida quando o poço é novo, enquanto em poços antigos 75 a 90% (Ammar *et al.*, 2018; Fakhru'l-Razi *et al.*, 2009).

Os componentes presentes em AP variam segundo geologia do reservatório de petróleo, localização geográfica, histórico de injeção de água e composição de hidrocarbonetos de petróleo extraído (Ammar *et al.*, 2018; Cakmakce *et al.*, 2008). No ano de 2017, foram descartados no mar 293 milhões de m<sup>3</sup> de água produzida no Brasil (PETROBRAS, 2017). Impactando o ecossistema aquático, devido à presença de compostos químicos orgânicos (benzeno, tolueno, xilenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA, fenol, fenóis alquilados e ácidos orgânicos) e inorgânicos (arsênio, cádmio, cromo, cobre, níquel, chumbo, vanádio e radionuclídeos) (Gondim *et al.*, 2017; Bakkel *et al.*, 2013; Motta *et al.*, 2013; Fakhru'l-Razi *et al.*, 2009).

Os efeitos causados por esses componentes ao meio ambiente são: o aumento da quantidade de sal, maior concentração de metais e maior quantidade de emissão de óleo disperso e solúvel na água do mar (Ammar *et al.*, 2018; Fakhru'l-Razi *et al.*, 2009). Uma das formas de reduzir os impactos causados é a utilização desta água residual como fonte de nutrientes para o crescimento das microalgas, aliada à produção de biocombustíveis e biomoléculas (Lam *et al.*, 2017). Classificados como combustíveis de 3ª geração possuem um papel importante neste cenário, pois podem ser produzidos a partir de águas residuais, tornando-se uma alternativa energética com significativas vantagens sobre biocombustíveis de 1ª geração (etanol de caldo de cana e biodiesel de óleo de soja) e 2ª geração (ex:

etanol de celulose) (Zhang *et al.*, 2020; Javed *et al.*, 2019; Collota *et al.*, 2018; Francisco *et al.*, 2015).

Um dos gêneros mais conhecidos da biotecnologia de microalgas é a *Chlorella vulgaris*, trata-se de uma microalga verde unicelular de crescimento fotoautotrófico, com alto poder de biorremediação de águas residuais, devido ao seu metabolismo mixotrófico, robustez, alta taxa de crescimento sob várias condições adversas e tolerância a altos níveis de metais pesados (Zhigang *et al.*, 2013). Diversos autores comprovaram sua eficiência na remoção de nitrogênio (80 - 90%), fósforo (81 - 80%), e demanda química de oxigênio (DQO) (>50%) (Evans *et al.*, 2017; Karyal *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 1995). Além disto, possui grande potencial biotecnológico para diversos setores industriais devido sua composição bioquímica (proteína ~56,8%; lipídios ~16,9% e carboidrato ~5,9%) e pigmentos como carotenoide e clorofilas que pode atingir 1–2% do peso seco. Esses pigmentos têm propriedades antioxidantes, atuam na regulação do colesterol e na fortificação do sistema imunológico (Niccolai *et al.*, 2019; Kulkarni *et al.*, 2018; Safi *et al.*, 2014).

Estudos recentes avaliaram a eficiência de reciclagem e tratamento de efluentes anaeróbicos de água residual petroquímica cultivando *Tribonema sp.* (Huo *et al.* 2019). Jaén-Gil *et al.* (2020) avaliaram a eficiência da biotransformação de cloreto de benzalcônio (BAC<sub>C12</sub> e BAC<sub>C14</sub>) durante 14 dias de tratamento em água do mar e água produzida durante 14 dias. Entretanto, existem poucos relatos que investigam a remoção de componentes químicos de campos petrolíferos simultaneamente a síntese de biomoléculas por microalgas (Ammar *et al.*, 2018; Arriada *et al.*, 2014). Sendo assim, este estudo pretende caracterizar a biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada com suplementação diária de água produzida, visando além do conhecido caráter biorremediador da espécie microalgal, verificar a produção de biomoléculas de interesse comercial.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Coleta, Composição química da água produzida e eficiência de remoção**

A água produzida foi coletada no município de Santo Amaro das Brotas (10°46'44" Sul;

37°3'30" Oeste) localizado a 41 km da capital Aracaju, estado de Sergipe (SE) -Brasil (cedida por uma empresa de exploração petrolífera), transportadas para a Universidade Federal da Bahia (UFBA) em frascos plásticos estéreis sob refrigeração e congeladas a -20 °C, até a sua utilização.

A composição química da água residual foi analisada no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador - BA. As características físico-químicas da água foram determinadas (Cloro (Cl<sup>-</sup>), Chumbo (Pb), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Vanádio (V), Níquel (Ni), Titânio (Ti), Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cromo (Cr), Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), pH, Salinidade, Óleos e graxas totais). As características físico-químicas e os metais presentes foram analisados usando os métodos padrão para análise de água e esgoto (Rice et al., 2017) e por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (SM-3120B).

Para o cálculo da eficiência de remoção de nutrientes, foram utilizados apenas os componentes que sofreram redução após o período de cultivo. Seguindo a equação 1, proposta por Cardoso *et al.* (2020).

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = (CI - CF / CF) \times 100$$

Onde, CI é a concentração inicial e CF é a concentração final.

## 2.2 Preparação e Obtenção do inóculo

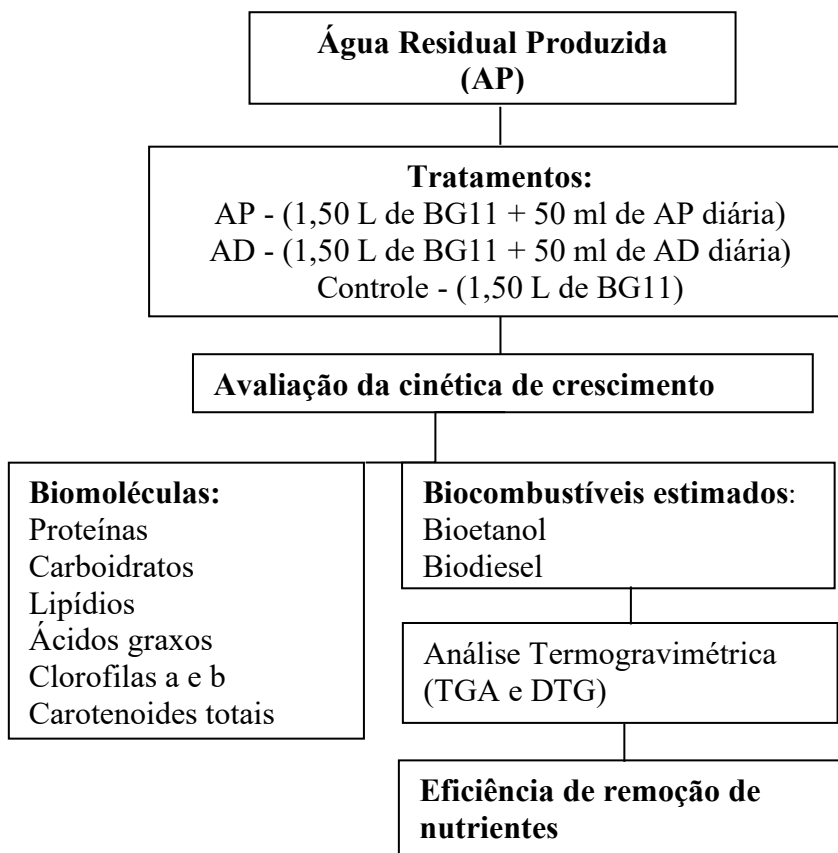
A cepa de *C. vulgaris* foi obtida do Banco de Microalgas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LabBioTec) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Para obtenção do inóculo utilizado nos experimentos, a cepa de *C. vulgaris* foi cultivada em reatores tipo *Erlenmayer* com volume de trabalho de 2 litros, a 30 °C com fotoperíodo claro/escuro de 12 horas em meio sintético BG11 (NaHCO<sub>3</sub>; NaNO<sub>3</sub>; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.xFe<sub>3</sub>+NH<sub>3</sub>; EDTA; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>+H<sub>2</sub>O e solução de metais traço H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub> + 4H<sub>2</sub>O; ZnSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O; NaMoO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> + 5H<sub>2</sub>O) (Ammar *et al.*, 2018; Otondo *et al.*, 2018). O ar foi fornecido a cultura e lâmpadas

fluorescentes tubulares com intensidade luminosa de  $41,6 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram utilizadas como fonte de energia.

Ao atingir concentra\u00e7\u00e3o celular de  $\sim 1,3 \text{ gL}^{-1}$  em fase exponencial de crescimento, a biomassa foi recuperada por centrifuga\u00e7\u00e3o (Eppendorf 5702 R) a 4400 rpm por 4 min, lavada com \u00e1gua destilada e centrifugada novamente (4400 rpm por 4 min) para remo\u00e7\u00e3o de interferentes provenientes do cultivo.

### 2.3 Condi\u00e7\u00f5es de cultivo e Fluxograma experimental

O fluxograma (Figura 1) apresenta os experimentos realizados, com o objetivo de definir as melhores condi\u00e7\u00f5es atrav\u00e9s dos par\u00e2metros de crescimento, composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica da biomassa e estimativa te\u00f3rica de biocombust\u00edveis.



**Figura 1.** Fluxograma experimental e caracteriza\u00e7\u00e3o da biomassa de *Chlorella vulgaris* adaptada em meio BG 11 adicionado diariamente com 50 ml de \u00e1gua produzida (AP), \u00e1gua destilada (AD) e controle durante 26 dias.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata utilizando fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume de trabalho (2 L), com concentração celular inicial de  $\sim 0,3 \text{ gL}^{-1}$ , fotoperíodo 12 horas claro/escuro a 28 °C durante 26 d. A iluminação foi fornecida por lâmpadas tubulares fluorescentes com  $41,60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A aeração foi realizada através da injeção de ar, acoplados com lã de vidro e os experimentos não foram autoclavados. Os tratamentos submetidos a estas condições de cultivo foram AP (1,5 L de BG11 adicionado diariamente com 50 ml de AP); AD (1,5 L de BG11 adicionado diariamente com 50 ml água destilada - AD) e Controle (1,5 L de BG11 C) (Aslam *et al.* (2017).

## 2.4 Parâmetros de crescimento

A concentração da biomassa de *C. vulgaris* foi determinada diariamente, a partir da densidade óptica das culturas em espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) no comprimento de onda 680nm. Uma curva padrão foi construída antes dos experimentos, relacionando a densidade óptica do inoculo com sua massa seca (Costa *et al.*, 2002). Parâmetros de crescimento foram determinados para cada dia de cultivo. A produtividade foi obtida pela Equação  $P_X = (X_t - X_0) / (t - t_0)$ , onde  $X_t$  é a produção de biomassa ( $\text{gL}^{-1}$ ),  $t$ (d) tempo e  $X_0$  a concentração de biomassa ( $\text{gL}^{-1}$ ) no tempo  $t_0$ (d) inicial. A taxa de crescimento específica ( $\mu_{\text{esp}}$ ) foi obtida a partir da regressão linear na fase log de cultivo.

No final do cultivo a biomassa foi recuperada por centrifugação (Eppendorf 5702 R) a 4400 rpm por 4 min, lavada com água destilada e centrifugada novamente (4400 rpm por 4 min) para remoção de interferentes provenientes do cultivo, a biomassa obtida foi congelada (-80°C), liofilizada e armazenada a -20°C para análises posteriores.

## 2.5 Composição bioquímica da biomassa

O rendimento de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005), com um



fator de conversão de 5,22 específico para microalgas (Lourenço *et al.*, 2002). A determinação de cinzas foi realizada de acordo com Andrade *et al.* (2019) utilizando método termoanalítico, onde o teor de cinzas foi obtido diretamente da porcentagem do produto de decomposição térmica na temperatura de 600 °C. O teor de umidade foi obtido a partir da primeira etapa de perda de massa melhor visualizada pela curva DTG entre 25 e 150 °C (Araújo *et al.*, 2006). O conteúdo lipídico total da biomassa foi extraído com uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1) e quantificado por gravimetria, conforme descrito por Folch *et al.* (1957). A determinação de carboidratos foi obtida pela diferença entre as quantidades de proteína bruta, lipídios totais, cinzas e umidade Andrade *et al.* (2019).

A análise das clorofilas *a* e *b*, e de carotenoides totais foi realizada conjuntamente, seguindo Lichtenthaler and Buschmann (2001) (Equação 1). Foram pesados 0.2 g da amostra liofilizada, em balança analítica (Shimadzu AY220), em seguida, misturada a 25 mL de acetona 80% (v/v). A mistura foi agitada em vórtex (Phoenix AP 56), centrifugada (Eppendorf 5702 R) a 4000 rpm, por 5 minutos, provocando a lise celular com posterior precipitação. O sobrenadante foi centrifugado novamente para maximizar a extração de pigmentos e para torná-lo límpido. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) nos comprimentos de onda de 663 nm para clorofila *a*, 647 nm para clorofila *b* e 470 nm para carotenóides. As concentrações dos pigmentos foram expressas em  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ .

(Eq. 1)

$$1 - C_a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$2 - C_b = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{663}$$

$$3 - C_{CT} = [1000 A_{470} - (1,82 C_a - 85,02 C_b)]/198$$

Onde:

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

$A$  = Absorbância e Coeficiente de extinção: 12,25 e 2,79 ( $C_a$ ); 21,50 e 5,10 ( $C_b$ ); 1000,00; 1,82, 85,02 e 198 ( $C_{CT}$ ).

## 2.6 Composição de Ácidos Graxos

A análise dos ácidos graxos da biomassa das três amostras (AP, AD e C) foram realizados seguindo Nascimento *et al.* (2013). Foram pesados 15 a 25 mg de lipídios, em balança analítica (Shimadzu AY220) e misturados a 1,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 N em metanol (MeOH). A mistura foi aquecida por 10 minutos a 100°C em banho maria e resfriada em água corrente. Em seguida adicionou-se 2,0 mL de solução de trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) em metanol 12% e aqueceu por 40 minutos em banho-maria e resfriada em água corrente. Após adicionar 2,0 mL de isoctano e 5,0 mL de solução saturada de NaCl a mistura foi agitada em vórtex durante 5 minutos e retirado o sobrenadante. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) presentes no sobrenadante foram separados e identificados em um cromatógrafo a gás (Clarus 680; Perkin Elmer<sup>®</sup>) com uma coluna DB-FFAP (30 m × 0.32 mm × 0.25 mm) e equipados com um detector de ionização de chama. Os parâmetros de análise incluíram temperaturas do injetor e detector de 250°C e 280°C, respectivamente. Utilizou-se o programa de temperatura a seguir: 150°C por 16 min, aumentando em 2 °C/min até 180°C. Essa temperatura foi mantida por 25 min e em seguida foi feito um aumento de 5 °C/min até 210°C, mantido por 25 min. Foi utilizado hélio como gás de arraste a 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Um fluxo de gás hidrogênio e de ar sintético foi fornecido em 30 e 300 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. As injeções foram realizadas em duplicata para cada extração em um volume de 1 µL. Os FAME foram identificados comparando os tempos de retenção com uma mistura de padrões conhecidos (C4-C24, 18, 919-AMP; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). A quantificação dos ácidos graxos, expressa em mg g<sup>-1</sup> de lipídeos foi realizada pela adição do padrão interno tricosanoato de metila (C23:0; Sigma Aldrich<sup>®</sup>). As áreas dos picos foram determinadas através do software ClarusChromatographyworkstation para normalizar a porcentagem de áreas de ácidos graxos totais (Nascimento *et al.*, 2013).

## 2.7 Avaliação das propriedades de biodiesel

As mais importantes propriedades de combustível foram avaliadas para todas as biomassas,

partindo do seu perfil de ácidos graxos, usando equações empíricas relatadas por Nascimento *et al.* (2013). As propriedades incluem valor de saponificação (VS), valor de iodo (VI), número de cetano (NC), grau de insaturação (GI), fator de saturação de cadeia longa (FSCL) e ponto de entupimento do filtro frio (PEFF). Os cálculos de VI e VS foram baseados nos valores de SV e IV dos óleos vegetais de palma, amendoim e soja.

$$NC = 46,27 + (5458,3/VS) - (0,225 \times VI) \quad (\text{Eq. 2})$$

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

$$VI = \Sigma (254 \times D \times N)/M \quad (\text{Eq. 4})$$

$$UD = MUFA + (2 \times PUFA) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$FSCL = (0,1 \times C16) + (0,5 \times C18) + (1 \times C20) + (1,5 \times C22) + (2 \times C24) \quad (\text{Eq.6})$$

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

## 2.8 Conversão teórica de carboidratos da biomassa em etanol

Foram realizados cálculos teóricos para avaliar a conversão de carboidratos em bioetanol a partir da produção de carboidratos na biomassa de *Chlorella vulgaris*. Para tanto, considerou-se como base de cálculo 100 g de biomassa, conversão estequiométrica teórica de glicose em etanol de 0,511 e 70% de eficiência na formação de etanol (Rosa *et al.*, 2015).

## 2.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) (PerkinElmer Modelo Pyris 1 TGA) foram realizadas para determinar o comportamento de pirólise das biomassas. Foram utilizadas 5 mg de amostra com razão de aquecimento de 10 °C/min, com temperatura de 25 a 900 °C sob um fluxo de Nitrogênio de 20 mL·min<sup>-1</sup> (Jesus *et al.*, 2018). Determinou-se a temperatura inicial de decomposição (T<sub>onset</sub>), final e temperatura máxima de decomposição (T<sub>decomp</sub>).

## 2.10 Análise estatística

Os resultados experimentais foram analisados através do programa STATISTICA 10.0, utilizando uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 95,0%.

### 3.0 Resultados e discussões

#### 3.1 Composição química da água produzida e eficiência de remoção

A maioria dos metais pesados são considerados tóxicos para grande parte dos seres vivos (Ansilago *et al.*, 2016; Oliveira, 2007), conforme foi observado neste estudo a ausência dos metais NO<sub>3</sub>; Pb; As; Cd;Ni;Co;V;Ti e Cr) na água residual possibilitou a produção de biomassa de *Chlorella*. De acordo com Almomani *et al.* 2020, a presença de íons metálicos tóxicos na água ou águas residuais, mesmo em baixas concentrações, podem causar problemas ambientais para organismos bióticos e na saúde dos humanos. Segundo Sforza *et al.* 2020 a utilização de pré tratamento (biochar), com ausência de metais como Al, As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb, Se, Si, Ti, e a diminuição do Cr possibilitaram o crescimento da microalga *Chlorella protothecoides* em águas residuais de curtume.

Componente	LQ	Antes do Tratamento (mg/L)	Após o tratamento (mg/L)	Eficiência de Remoção (%)
Cloro (Cl <sup>-</sup> )	8,00	75.157,00	51.725,00	31,18
Nitrato (NO <sub>3</sub> )	2,50	< 2,50	< 2,50	-
Chumbo (Pb)	0,10	< 0,10	< 0,10	-
Arsênio (As)	0,10	< 0,10	< 0,10	-
Cádmio (Cd)	0,10	< 0,10	< 0,10	-
Níquel (Ni)	0,01	< 0,01	< 0,01	-
Cobalto (Co)	0,01	< 0,01	< 0,01	-
Cobre (Cu)	0,02	0,20	0,06	70,00
Manganês (Mn)	0,10	2,90	0,67	76,89
Molibdênio (Mo)	0,05	2,30	< 0,05	97,82
Vanádio (V)	0,05	< 0,05	< 0,05	-
Níquel (Ni)	0,01	< 0,01	< 0,01	-
Titânio (Ti)	0,05	< 0,05	< 0,05	-
Ferro (Fe)	0,05	0,54	< 0,05	90,74
Zinco (Zn)	0,01	0,29	< 0,01	96,55
Cromo (Cr)	0,01	< 0,01	< 0,01	-
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	2,00	83,40	50,20	39,80
Hidrocarbonetos totais de petróleo	400,00	778,00	< 400,00	48,59
HTP(µg/L)				
pH (25°C)	1 - 14	6,92	6,70	-
Salinidade(g/L)	5,00	76,80	60,40	21,35
Óleos e Graxas totais	5,00	5,20	< 5,0	3,85
Sólidos totais dissolvidos(g/L)	1,00	59,90	53,40	10,85

Alguns metais pesados podem ser necessários para muitos micro-organismos em determinadas concentrações e ou associações, conhecidos como metais traços ou elementos traços, fazem parte do funcionamento dos processos fisiológicos e metabólicos das microalgas. Elementos traços como Cobre (Cu), Manganês (Mn) e Molibdênio (Mo), Zinco (Zn) e Ferro (Fe) que obtiveram eficiência de remoção de 70%, 76,89%, 97,82%, 96,55% e 90,74% respectivamente, fazem parte do metabolismo de algumas espécies de microalgas, incluindo a *Chlorella* utilizada no presente estudo (Ansilago *et al.*, 2016). Esses microminerais, embora em pequeníssimas quantidades são fundamentais no funcionamento celular das microalgas (Magro *et al.*, 2016). Segundo Fox e Zimba, 2018 as concentrações de manganês (Mn) (15 - 25.950 mg / kg), molibdênio (Mo) (0 - 2,35 mg / kg), cobre (Cu) (0 - 9.49 mg / kg), Zinco (Zn) (3,8 - 219.000 mg / kg) e Ferro (Fe) (15 - 49.510mg / kg) podem variar de acordo com a espécie microalgal.

Os resultados encontrados de remoção são reforçados pelos conhecimentos metabólicos conhecidos das microalgas, como em funções metabólicas pertencentes ao manganês associadas aos processos enzimáticos e ao equilíbrio da taxa fotossintética; o molibdênio é essencial na fixação de nitrogênio e participa de reações redox devido à sua capacidade de alterar os estados de valência; o cobre que é essencial no transporte de elétrons da respiração mitocondrial, na atividade da enzima plastocianina que atua nos fotossistemas e da superóxido dismutase (SOD), uma importante enzima antioxidante que age nos tilacóides e no estroma dos cloroplastos; O zinco é reconhecido como um nutriente mineral necessário para o crescimento da maioria das algas. É um co-fator e ativador em muitas reações enzimáticas e é encontrado em metaloproteínas. O ferro é um componente crítico das reações redox e na formação de clorofila. Por esse motivo, é considerado o mais essencial de todos os metais traço. O ferro possui maior importância, pois é fundamental no crescimento exponencial celular, quanto para o funcionamento fotossintético das células e para a respiração microalgal. (Fox *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2016; Nauert; Knauer, 2008; Saksahug *et al.*, 1997).

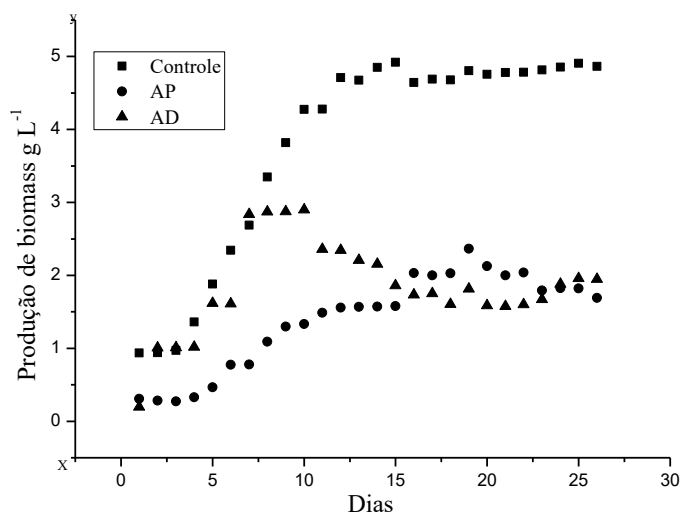
Resultados similares ao presente estudo foram encontrados quando a *Chlorella vulgaris* foi cultivada meio padrão derivado de microbiologia (MLA), suplementado com três diferentes águas residuais (águas residuais primárias (PWW), águas residuais secundárias (SWW), efluentes de petróleo (PE)) em diferentes proporções (0 a 100%). A eficiência de remoção de Mn e Cu nos efluentes PWW e SWW foram de 95% e 100% respectivamente. Para o efluente PE a remoção de Mn e Cu foram de 84% e 13% respectivamente. O Fe obteve remoção de 95%, 73% e 57% nos efluentes PWW, SWW e PE e Zn 100% para PWW e SWW (Znad *et al.*, 2018)

A degradação de compostos aromáticos avaliada por Cerniglia *et al.* (1980), observaram que microalgas eucarióticas e procarióticas oxidavam hidrocarbonetos aromáticos. O que justifica os resultados encontrados no presente estudo, onde os HTPs sofreram redução de 48,59 %. Resultados

superiores ao presente estudo, foram relatados por Abid et al. 2017 utilizando microbiota hidrocarbonoclástica nativa e microalga *Spongiocloris sp* em águas residuárias de petróleo onde obtiveram eficiência de remoção de hidrocarbonetos totais – HTP de 99,18%. A diferença dos resultados podem estar relacionada ao fato dos autores utilizarem bactérias juntamente com microalgas, para obter o efeito biorremediador.

### 3.2 Parâmetros de crescimento e determinação de pH

Na Figura 2 é apresentada a curva de produção de biomassa *Cholrella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50mL de água produzida (AP) e água destilada (AD) diariamente e um controle (C). É possível observar que os tratamentos controle e AP apresentaram fase de adaptação de 4 dias.



**Figura 2.** Produção de biomassa de *Cholrella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50ml de água produzida (AP) e água destilada (AD) e controle (C) durante 26 dias

Ammar et al. (2018) relataram fase lag de 7 dias em *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* cultivada com 10 a 50% de água produzida em meio BG11 modificado. Os autores relacionam os resultados ao tempo de adaptação das microalgas as novas condições de cultivo. A redução de 3 dias na fase lag ocorrida no presente estudo, pode esta relacionada a quantidade de água residual adicionada ao cultivo e ao aporte de nutrientes oriundos da água residual. Segundo

Daneshvaret *al.* (2018) fases pequenas de adaptação revelam boa adaptação das microalgas às novas condições de cultivo.

O cultivo controle e AD atingiram a fase estacionária no 15º dia ( $4,64\text{gL}^{-1}$ ) e 7º dia de cultivo ( $2,84\text{ gL}^{-1}$ ), respectivamente. No entanto, a curva de AP parece atingir a fase estacionária no 10º dia de cultivo, entretanto, após o 16º dia ocorre um aumento da concentração celular com dois picos relevantes de produção nos dias 16( $2,03\text{g L}^{-1}$ ) e 19 ( $1,95\text{ g L}^{-1}$ ). De acordo com Abid *et al.* (2017) em cultivos de água produzida, devido a presença de bactérias endógenas, ocorre um período de crescimento progressivo e um período de ajuste durante o qual o consorcio microalga-bactéria assimilam os co-produtos da degradação de hidrocarbonetos. Outro fator é a formação de polímeros extracelulares (EPS), segundo Wang *et al.* (2014) *Chlorella sp.* cultivadas em águas residuais, tendem a ter uma maior expressão de EPS devido à alta carga de nutrientes e uma relação N / P altamente desequilibrada.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da cinética de crescimento. É possível observar que o tratamento controle apresentou maior produção de biomassa ( $4,87\text{ g L}^{-1}$ ) ao final do cultivo que Ap ( $1,69\text{ g L}^{-1}$ ) e AD ( $1,95\text{ g L}^{-1}$ ). Os resultados encontrados em AP podem estar relacionados à presença de Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que segundo Shahi *et al.* (2016) quando presentes, estes compostos resultam em uma adaptação entre as comunidades microbianas (bactérias e microalgas) devido a metabolização de vários tipos de moléculas de hidrocarbonetos. Resultados inferiores ao presente estudo, foram relatados por Ammare *et al.* (2018) em meio BG11 suplementado com 10 e 25% de água produzida, onde o crescimento específico foi de ( $0,15$  e  $0,17\text{ d}^{-1}$ ) *N. oculata* e ( $0,16$  e  $0,15\text{d}^{-1}$ ) *I. galbana*, respectivamente. Os autores observaram produção de biomassa ( $0,85$  e  $1,01\text{ g L}^{-1}$ ) *N. oculata* e ( $0,95$  e  $0,69\text{ g L}^{-1}$ ) *I. Galbana*.

A maior produção de biomassa em comparação aos estudos relatados, pode estar relacionado também a fotossíntese, que proporcionam oxigênio (aceitador de elétrons chave) para a degradação do poluente por bactérias heterotróficas presentes na água residual, fornecendo  $\text{CO}_2$  durante a degradação

dos hidrocarbonetos orgânicos, produzindo um sistema de co-metabolismo (Croft *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008; Abid *et al.*, 2017).

**Tabela 2.** Parâmetros cinéticos de produção de biomassa ( $\text{gL}^{-1}$ ), crescimento específico ( $\text{d}^{-1}$ ) e produtividade de biomassa ( $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50ml de água produzida (AP) e água destilada (AD) durante 26 dias e controle (C).

Cultivos	Produção de biomassa ( $\text{gL}^{-1}$ )	$\mu$ específico ( $\text{d}^{-1}$ )	Produtividade ( $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ )
Controle	$4,87 \pm 0,04^a$	$0,24 \pm 0,04^a$	$0,03 \pm 0,01^a$
AP	$1,69 \pm 0,57^b$	$0,25 \pm 0,09^a$	$0,01 \pm 0,01^b$
AD	$1,95 \pm 0,01^c$	$0,34 \pm 0,09^b$	$0,04 \pm 0,01^a$

Média  $\pm$  desvio padrão. Letras equivalentes sobrepostas (a-b) no mesmo tipo de coluna indicam que não houve diferença significativa entre os valores do nível de confiança de 95%. A análise estatística foi delineada pelo teste de Tukey.

De acordo com (Wuang *et al.*, 2016) as microalgas possuem o potencial de fitorremediar compostos químicos em águas residuais, servindo como tratamento sustentável devido a sua alta eficiência de remoção de nutrientes. Além disso, quanto maior crescimento das microalgas mais eficiente será a remoção desses constituintes (Nie *et al.*, 2020; Wuang *et al.*, 2016; Nasir *et al.*, 2015).

A produção máxima de biomassa para o controle ocorreu no 15º dia ( $4,92 \text{ g L}^{-1}$ ); AD no 10º dia ( $2,90 \text{ g L}^{-1}$ ) e no 19º dia AP ( $2,37 \text{ g L}^{-1}$ ) de cultivo. Abid *et al.* (2017) demonstraram que a produção máxima de  $2,95 \text{ g L}^{-1}$  de *Spongiocloris* sp. foi atingida em 80 dias, cultivada em fotobiorreator tipo airlif tem batelada, com injeção de  $\text{CO}_2$  e água residual de petróleo. Os autores sugerem que o acoplamento microalga-bactéria reforça o processo de desintoxicação da água quando comparados com os microrganismos individuais (apenas microalga ou bactéria). Segundo Znad *et al.* (2018) *Chlorella vulgaris* atingiu o máximo crescimento ( $1,62 \text{ gL}^{-1}$ ) após 10 dias de cultivo em água produzida, devido à alta remoção de 80% de N e 100% de P, foram utilizados como substrato. Além disto, o alto nível de carbono total ( $137 \text{ mg L}^{-1}$ ) favoreceu o crescimento.

Os resultados favoráveis de crescimento de *C. Vulgaris* podem estar relacionados à presença em baixas concentrações do Manganês ( $0,90 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ausência de outros metais pesados na água residual. De acordo com Muñoz e Guieysse. (2006) altos níveis de metais pesados podem inibir o crescimento, fotossíntese e outras vias metabólicas, levando a mudanças no tamanho e forma das



células.

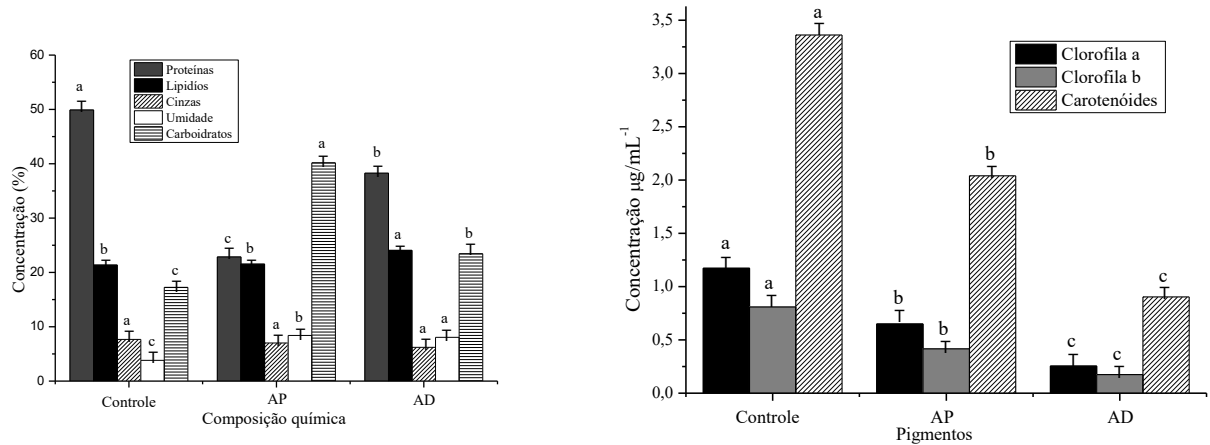
A salinidade das águas residuais é medida considerando o total de sólidos dissolvidos (STD), geralmente entre 1 e 10 g L<sup>-1</sup>. A água residual utilizada no presente estudo, apresentou valor de salinidade 62,38 g L<sup>-1</sup> e STD 93,13g L<sup>-1</sup>, valor 9 vezes superior ao encontrado. Assim, a concentração elevada de sais, pode ser uma fonte de estresse, contribuindo para o baixo valor de produtividade de AP (0,01 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) comparado aos outros tratamentos, pois alta salinidade pode influenciar negativamente a atividade metabólica das células (Li *et al.*, 2020).

O valor  $\mu_{\text{específico}}$  de AP não apresentou diferença estatística do Controle. Canedo-López *et al.* (2016) relatou no cultivo de *C. Vulgaris* em água residual sintética sob condição mixotrófica valor de  $\mu_{\text{específico}}$  0,33 d<sup>-1</sup>, superior ao encontrado. Resultados inferiores ao presente estudo, foi relatado por Ammaret *al.* (2018) em *N. oculata* (0.151 d<sup>-1</sup>) e *I. galbana* (0.144 d<sup>-1</sup>) ao investigar a viabilidade do cultivo dessas duas espécies de microalgas, em meio de cultura contendo água produzida em campo petrolífero (PW), para tratamento simultâneo de águas residuais e produção de biomassa usando diferentes cargas de efluente (10 a 50%) de PW. O maior rendimento em biomassa desse estudo pode estar relacionado à presença de bactérias, que auxiliam o processo de degradação de poluentes complexos transformando-os em pequenas moléculas orgânicas, facilmente utilizadas pelas microalgas (Zhang *et al.*, 2012).

### 3.4 Composição bioquímica da biomassa

Na Figura 3 são apresentados os resultados da composição bioquímica das biomassas, obtidas nos três diferentes processos de produção. É possível observar que o teor de proteína (49,88%) foi maior no cultivo controle comparado aos tratamentos AD (38,24%) e AP (22,83%). Podendo estar relacionado, a presença de óleos e graxas totais na água residual (11,80 mgL<sup>-1</sup>), porque a presença destes componentes provoca inibição da fotossíntese, desencadeando a diminuição da absorção de luz, dos fotossistemas e da geração de energia através do transporte de elétrons (Liu *et al.*, 2019). De

acordo com Liu *et al.* (2019) o teor de proteína de *Chlorella sp* têm correlação direta com a concentração de frações solúveis do óleo em água. O estudo observou uma redução no teor de proteína (0,68 a 0,45 ng cell<sup>-1</sup>) a medida que a concentração de óleo aumentava (0 a 5 mg L<sup>-1</sup>).



**Figura 3.** Composição bioquímica (A) e pigmentos (B) de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50 mL de água produzida (AP) e água destilada (AD) durante 26 dias.

Resultados similares ao presente estudo foram encontrados por Yunet *et al.* (2019) em *Chlorella vulgaris* YH703 cultivada sob estresse salino, onde o menor teor de proteínas (28,70%) foi encontrado nos tratamentos de 500 e 600 mM de NaCl. Os autores relacionam os resultados ao metabolismo geral da espécie, sob condições adversas (estresse por salinidade), sintetizando várias espécies reativas de oxigênio (ERO) que reduzem a produção de macromoléculas celulares como proteínas, lipídios e DNA.

De acordo com Lawton *et al.* (2015) o conteúdo reduzido de proteínas nas culturas de *Chlorella* crescidas em altas concentrações de sal redireciona a energia disponível para processos adaptativos, como a osmorregulação, que reduz a síntese de proteínas e aumenta a síntese de carboidratos. Este mecanismo explica as menores concentrações de proteínas encontradas no tratamento (AP) em relação ao controle, e o aumento de carboidratos (40,19%). Além disto, o metabolismo microalgal que utiliza CO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub> como substrato, realizando transporte ativo de carbono inorgânico, acumulando bicarbonato intracelular e estimulando a anidrase carbônica interna (Ho *et al.*, 2011). Desta forma, microalgas utilizam a energia gerada a partir desses eventos para aumentar as concentrações

intracelulares promovendo o acúmulo de carboidrato sob condições de estresse (Chen *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2011;).

Resultados similares foram encontrados por Yunet *al.* (2019) no conteúdo de proteínas e carboidratos de *Chlorella vulgaris* YH703 cultivada na concentração de 500 mM de NaCl foi de 30,2% e 36,7% respectivamente. O maior teor de carboidratos (37,4%) e o menor teor de proteínas (28,7%) foram encontrados nos tratamentos de 500 e 600 mM de NaCl. Além disto, biomassas com altos teores de carboidratos podem ser fontes de substratos para obtenção de bioetanol, devido à vantagem de seus carboidratos não conter lignina e as células geralmente não são recalcitrantes, reduzindo os custos associados ao pré-tratamento (Duarte *et al.*, 2019).

Os resultados de cinzas para os tratamentos AP (7,03%) e AD (6,21%), foram inferiores ao controle (7,67%), no entanto, não apresentaram diferença significativa. A quantidade de cinza encontrada pode ser atribuída a metais alcalinos presentes na água residual e, conseqüentemente, bioacumulados nas células das microalgas (Cardoso *et al.*, 2020). Concentração de cinzas superior a 16,06% foi relatada por Xu *et al.* (2019) em *Chlorella* cultivada em água residual de esgoto e produzida por liquefação co-hidrotérmica. Após avaliar a composição de bio-óleo da biomassa, observou-se que as cinzas apresentaram efeito na formação e propriedade bio-óleo, composto principalmente de amidas, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos e fenóis. Além disso, cinzas em estado de pirólise provavelmente contribuem para uma melhoria na bio-qualidade enquanto os compostos metálicos nas cinzas em estado de oxidação ou redução são provavelmente responsáveis por um aumento no rendimento do bio-óleo.

Quanto ao teor de lipídios os tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ), sendo o maior valor encontrado em AD (24,08 %), AP (21,53 %) e Controle (21,37%), respectivamente. De acordo com Hu *et al.* (2008) sob as diversas condições de cultivo, a membrana fotossintética das microalgas é rapidamente degradada e os lipídios enriquecidos com triacilgliceróis (TAG) são acumulados no citosol, devido ao mecanismo de armazenagem energética. Resultados

similares ao presente estudo foram encontrados por Yun *et al.* (2019) que afirmaram o potencial de *Chlorella vulgaris* YH703 como substrato para biocombustíveis, quando submetida ao cultivo com estresse salino (500 mM NaCl) durante 2 d, resultando em conteúdo lipídico de 24,5%. Desta forma, todos os tratamentos deste estudo, possuem potencialidade para exploração como produtor de biocombustíveis.

Os principais componentes tóxicos de hidrocarbonetos de petróleo são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e benzenos. Estes podem ser acumulados por microalgas como a *Chlorella* (devido à alta capacidade lipofílica), causando vários efeitos nocivos (Liu *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2011). Dentre eles, a redução dos pigmentos como observado no presente estudo, onde o controle apresentou maior concentração de clorofila a ( $1,20\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), b ( $0,80\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) e carotenóides ( $3,40\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) comparado os tratamentos AP (0,65 (a) e 0,42(b) e carotenóides  $2,4\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) e AD (0,30 (a), 0,20 (b) e  $0,90\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  carotenóides).

No entanto o tratamento AD apresentou diminuição desses pigmentos, ligado ao estresse provocado pela redução dos nutrientes devido à inserção diária de uma água sem sais. Segundo Markou *et al.*, (2013) a baixa de nutrientes potencializada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas por condições de estresse, provocam a diminuição significativa do conteúdo desses pigmentos na biomassa.

Os valores de clorofila a e b encontrados para AP ( $0,65$  e  $0,42\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , respectivamente), ocorreram devido à presença dos hidrocarbonetos na água residual, que bioacumulam, provocando a redução do rendimento fotoquímico primário, da capacidade de transporte eletrônica, inibição do fotossistema II e a da liberação da atividade do centro de oxigênio (Liu *et al.*, 2019). Outro fator é a alta salinidade da água residual, porque normalmente sob estresse salino, ocorre a degradação e redução de pigmentos fotossintéticos. Valores superiores ao presente estudo foram relatados por Yun *et al.* (2019) em *Chlorella vulgaris* YH703 cultivada em concentração 200 mM de NaCl, para clorofila a ( $2,25\mu\text{g}/\text{mL}$ ), b ( $1,23\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e inferiores para carotenóides ( $0,61\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Valores superiores ao presente estudo foram relatados por Huo *et al.* (2020) em uma co-cultura de *Chlorella sp* e bactérias de águas residuais (*Bacillus firmus* e *Beijerinckia fluminensis*), cultivadas em águas residuárias originada da produção de vinagre para clorofila a (2,4µg/L), b (1,4µg/L) e inferiores para carotenoides (1,8 µg/mL). De acordo com Daneshvaret *et al.* (2018) os carotenoides são considerados biomarcadores sensíveis de poluentes no ambiente aquático. Assim, sua redução em AP pode estar relacionada à redução na concentração de contaminantes.

### **3. 5 Conversão teórica de carboidratos da biomassa em etanol**

A produção teórica estimada de etanol a partir dos carboidratos de *Chlorella vulgaris* foi maior em AP (18,22 mL/100g de biomassa) quando comparado aos tratamentos AD (10,20 mL/100g de biomassa) e Controle (7,70 mL/100g de biomassa). Esses resultados estão relacionados ao mecanismo que microalgas utilizam carboidratos como componentes estruturais das paredes celulares e armazenamento intracelularmente, fornecendo energia necessária para o metabolismo em microalgas quando sujeitas ao estresse (Duarte *et al.*, 2019). Além disto, microalgas em condições de estresse estimulam uma maior síntese de carboidratos (Cardoso *et al.*, 2020; Silva e Bertucco *et al.*, 2016)

Freitas *et al.* (2017) observaram no cultivo de *Chlorella minutissima* usando pentoses, produção teórica de etanol de 39,1 mL em 100 g de biomassa e Rosa *et al.* (2015) cultivando *Spirulina sp.* LEB 18 com CO<sub>2</sub> e o absorvente químico monoetanolamina (MEA) obtiveram 12,8 mL de etanol. Assim, observou-se maior produção teórica de etanol quando comparado ao resultado de Rosa *et al.* (2015) com diferente linhagem de microalga.

Neste estudo, a alta concentração de carboidrato, pode estar atrelada a altas concentrações de sal, que provoca o direcionamento da energia disponível para a osmoregulação, aumentando a síntese de carboidratos (Lawton *et al.*, 2015). De acordo com Duarte *et al.* (2019) biomassas com altos teores de carboidratos podem ser fontes para obtenção de bioetanol. Sendo assim, o presente estudo demonstrou a viabilidade da produção de bioetanol pela biomassa de *C. vulgaris* produzida em AP,

devido ao alto teor de carboidratos.

### 3.6 Composição de Ácidos Graxos

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que os ácidos graxos majoritários em AP são C16:1n7, C18:3n6 e C18:2n6t. Segundo Matos *et al.* (2017) os principais ácidos graxos produzidos por processos enzimáticos, alongamento da cadeia de carbono e reações de desnaturação são os da família C16 e C18. Isto ocorre devido a ação do Acetil-CoA (acetil coenzima) que impulsiona a produção de ácidos graxos, através da enzima acetil-CoAcarboxilase (ACCase) que converte bicarbonato e acetil-CoA em Malonil-CoA, que é catalisada pela proteína malonilacetil (malonil-ACP). De acordo com Daneshvar *et al.* (2019) após o alongamento e a desnaturação da cadeia de carbono, o malonil-ACP forma ácidos graxos, principalmente da família C:16 e C:18.

Os ácidos graxos majoritários encontrados em AP, segundo Lam *et al.* (2017) são geralmente encontrados em outras matérias primas para produção de óleo, como soja, girassol e óleo de palma, conhecidos como substratos adequados para a produção de biodiesel. Ghosh *et al.* (2017) também relataram perfis semelhantes de ácidos graxos para *C. vulgaris* cultivada em meio gasto de biohidrogênio termofílico.

O perfil de ácidos graxos tende a mudar de acordo a condição de cultivo, o crescimento fisiológico da microalga e fatores bióticos e abióticos associados (Ammar *et al.*, 2018). Por esta razão, no presente estudo, ocorreu uma diferença no perfil de ácidos graxos entre os tratamentos. É possível observar um aumento no teor de C18:2n6t em AP, comparado ao controle. De acordo com Ammar *et al.* (2018), o aumento da salinidade provoca um ajuste na fluidez da membrana microalgal. Desta forma, o transporte de íons regula o equilíbrio osmótico, promovendo aumento da insaturação e do comprimento da cadeia favorecendo a indução do aumento de C18:2.

**Tabela 3.** Composição de ácidos graxos de *Cholrella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50ml de água produzida (AP), água destilada (AD) e controle (C) durante durante 26 dias.

Ácidos graxos	Controle		AP		AD	
	mg·g <sup>-1</sup>	%	mg·g <sup>-1</sup>	%	mg·g <sup>-1</sup>	%
<b>C4:0</b>	1,64 ± 0,01	12,98 ± 0,05	-	-	0,16 ± 0,01	0,79 ± 0,07
<b>C11:0</b>	-	-	0,17 ± 0,00	0,61 ± 0,00	-	-
<b>C13:0</b>	0,11 ± 0,02	0,84 ± 0,02	0,80 ± 0,04	4,55 ± 0,02	-	-
<b>C14:0</b>	0,38 ± 0,03	3,03 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,67 ± 0,05	0,54 ± 0,00	2,64 ± 0,01
<b>C14:1n5</b>	0,13 ± 0,05	0,99 ± 0,06	0,39 ± 0,02	2,25 ± 0,03	0,31 ± 0,00	1,51 ± 0,00
<b>C15:0</b>	-	-	-	-	0,19 ± 0,00	0,94 ± 0,00
<b>C16:0</b>	-	-	-	-	0,17 ± 0,00	0,82 ± 0,00
<b>C16:1n7</b>	2,97 ± 0,11	23,00 ± 0,17	5,42 ± 0,28	30,95 ± 0,27	4,17 ± 0,06	20,55 ± 0,05
<b>C17:0</b>	-	-	0,38 ± 0,01	2,15 ± 0,14	0,35 ± 0,00	1,72 ± 0,02
<b>C17:1n5</b>	0,51 ± 0,01	4,07 ± 0,02	0,80 ± 0,02	4,55 ± 0,09	0,28 ± 0,00	1,38 ± 0,00
<b>C18:0</b>	1,58 ± 0,02	12,52 ± 0,03	0,98 ± 0,02	5,58 ± 0,11	3,28 ± 0,02	16,17 ± 0,06
<b>C18:1n9c</b>	-	-	-	-	0,11 ± 0,01	0,53 ± 0,03
<b>C18:1n9t</b>	0,33 ± 0,07	2,64 ± 0,04	1,89 ± 0,10	10,77 ± 0,08	0,14 ± 0,04	0,67 ± 0,07
<b>C18:2n6c</b>	-	-	-	-	0,45 ± 0,01	2,20 ± 0,01
<b>C18:2n6t</b>	0,71 ± 0,03	5,62 ± 0,02	1,94 ± 0,09	11,06 ± 0,02	1,52 ± 0,04	7,50 ± 0,13
<b>C18:3n6</b>	1,34 ± 0,09	10,63 ± 0,03	3,02 ± 0,13	17,25 ± 0,01	3,24 ± 0,03	15,95 ± 0,05
<b>C20:0</b>	2,63 ± 0,19	20,86 ± 0,05	1,68 ± 0,07	9,61 ± 0,04	5,41 ± 0,03	26,63 ± 0,12
<b>C20:3n6</b>	0,35 ± 0,05	2,78 ± 0,02	-	-	-	-
<b>Total</b>	12,61 ± 0,07	100,00 ± 0,01	17,59 ± 0,76 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	20,32 ± 0,22 <sup>a</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Saturado</b>	6,31 ± 0,02	50,23 ± 0,04	4,13 ± 0,14 <sup>b</sup>	23,17 ± 0,36 <sup>b</sup>	10,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	49,71 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>Monoinsaturado</b>	3,94 ± 0,03	30,70 ± 0,07	8,50 ± 0,42 <sup>a</sup>	48,52 ± 0,46 <sup>a</sup>	5,01 ± 0,31 <sup>b</sup>	24,64 ± 1,25 <sup>b</sup>
<b>Poliinsaturado</b>	2,40 ± 0,09	15,93 ± 0,04	4,96 ± 0,22 <sup>a</sup>	28,31 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	25,65 ± 0,20 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão. As mesmas letras (a-b) na mesma classe de ácidos graxos indicam que não houve diferença significativa entre os valores no nível de confiança de 95%.

AP apresentou maior instauração que AD e Controle, o alto grau de instauração é importante porque regula a fluidez da membrana, adaptação térmica, transporte de elétrons e oxigênio (Andrade *et al.*, 2019). Além disto, é possível observar que existe uma variedade de ácidos graxos nos

tratamentos, sendo um importante fator para as propriedades de biodiesel, pois quantidades reduzidas de ácidos graxos poliinsaturados comprometem a estabilidade oxidativa devido à existência de duplas ligações (Piligaev *et al.*, 2015). Resultados similares ao presente estudo foram encontrados por Huo *et al.* (2019) cultivando *Tribonema sp.* em águas residuais petroquímicas, obtendo grau de saturação de 37,4% e 49,7% de monossaturação. Portanto, o alto teor lipídico de C:16-C:18 na biomassa, possibilita a produção de biodiesel de alta qualidade.

### 3.7 Avaliação das propriedades de biodiesel

Na tabela 4 é apresentada a estimativa teórica de biodiesel, calculados com base na composição de ácidos graxos da biomassa. A composição dos ácidos graxos da biomassa influencia a composição física e química do biodiesel como comprimento da cadeia e grau de insaturação (Tripathi *et al.*, 2015). É possível observar que o número de cetano variou de 49,22% (AP) a 60,37% (Controle). De acordo com Tripathi *et al.* (2015) estas variações estão relacionadas ao desempenho do motor, eficiência de combustão do diesel e emissões de óxido nitroso.

**Tabela 4.** Propriedades de biodiesel da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50ml de água produzida (AP), água destilada (AD) e controle (C) durante 26 dias.

Propriedades de Biodiesel	Tratamento		
	Control	AP	AD
Número de Cetano (%)	60.37	49.22	56.18
Valor de Saponificação	222.60	211.97	206.56
Valor de Iodo (g iodo/100 g)	46.30	101.32	73.37
Grau de insaturação (wt. %)	68.76	105.14	75.94
Fator de saturação de cadeia longa (wt.%)	27.12	12.40	34.80
Ponto de entupimento do filtro frio (°C)	68.73	22.48	92.84

Os resultados encontrados para todos os tratamentos estão de acordo com o recomendado pela Agência Nacional de Petróleo e Gás (ANPG) cetano  $\geq 45\%$  (todos os tratamentos) e a União Europeia (UE)  $\geq 51\%$  (apenas AP esteve ligeiramente abaixo). O alto teor de ácidos graxos da família C16:0 e C18:0 por possuírem maior quantidade de cadeia de carbono aumentam a saturação das moléculas



(Ramos *et al.*, 2009). Resultados similares foram relatados por Knothe *et al.* (2006) em óleos vegetais e Cardoso *et al.* (2020) na biomassa de *Spirulina sp.* cultivada em água residual da aquicultura e Ammarel *et al.* (2018) em *Chlorella vulgaris* NIOCCV cultivada em meio F/2 enriquecido com água residual em diferentes salinidades (1,5 e 5,0%).

Um parâmetro importante é a reação de saponificação (quantidade necessária para a saponificação de 1 g de óleo) que interfere na reação de transesterificação implicando na tecnologia associada à produção de biodiesel. Desta forma, um menor valor de saponificação representa uma melhor qualidade do biodiesel produzido (Cardoso *et al.*, 2020). No presente estudo, este parâmetro variou de 206,56 (AD) a 222,60 (Controle), de acordo com Nascimento *et al.* (2014) vegetais comumente usados na produção de biodiesel apresentam valores de saponificação entre 196–202 (óleo de palma), 189–195 (óleo de soja) e 188–194 (óleo de girassol), demonstrando o potencial dos tratamentos, comparado a fontes já utilizadas na indústria energética. Valores encontrados por Andrade *et al.* (2019) foram semelhantes ao presente estudo, onde o cultivo de *Spirulina sp.* LEB 18 em meio Zarrouk reutilizados (4 ciclos de produção de biomassa), obteve no controle (226,15), 1º ciclo (225,10), 2º (225,77), 3º (225,51) e 4º (256,83) valores de grau de saponificação.

Mesmo não pertencendo a Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) dos parâmetros de qualidade de biodiesel no Brasil, o valor de iodo (VI) trata-se de um importante parâmetro de qualidade, devido aos altos níveis de insaturação causados pela polimerização dos glicerídeos e pela formação dos depósitos no biodiesel (Francisco *et al.*, 2015). De acordo com a Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2008), as concentrações de iodo não devem exceder 120 g iodo/100 g e a legislação europeia (EM 14214) estabelecem o máximo de 120 g iodo/100 g. No presente estudo, todos os tratamentos estiveram de acordo ao preconizado por ambas as legislações.

Os resultados encontrados estão relacionados à correlação existente entre o valor de iodo e o grau de insaturação. Segundo Nascimento *et al.* (2013) o valor do iodo é uma medida da insaturação

total de um material graxo, ocorrendo uma relação linear: quanto maior instauração presente no óleo, maior o valor de iodo. Por esta razão, os resultados encontrados estão relacionados ao alto grau de insaturados presentes na biomassa. Resultados inferiores ao presente estudo, foram relatados por Ammaret *al.* (2018) em *Chlorella vulgaris* NIOCCV cultivada em meio F/2 enriquecido com água residual em diferentes salinidades variando de 93,02 a 81,83I<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup>. Os valores foram menores que biomassas já exploradas como biodiesel, óleo de soja (120-141) e óleo de girassol (110-143), demonstrando assim, o potencial da biomassa como biocombustível.

Componentes que afetam a estabilidade oxidativa do biodiesel como ar, calor, traços metálicos, peróxidos, luz ou características estruturais dos compostos graxos como ligações duplas, influenciadas pela posição bis-alil em ácidos graxos poliinsaturados comumente encontrados, como o ácido linolênico (possui duas posições bis-alil em C11 e C14), altamente suscetível à auto-oxidação que posições alil (Nascimento *et al.*, 2014; Knothe *et al.*, 2006 & Deshmukha *et al.*, 2019). No presente estudo, a concentração de C14 e C11 estiveram abaixo de 3%, demonstrando a baixa oxidação do biodiesel, resultados similares a Ammar *et al.* (2018).

O biodiesel rico em ésteres metílicos de ácido esteárico (C18:0) apresentam tendência de baixo ponto de obstrução de filtro frio(POFF), porque quando o biodiesel líquido é resfriado, são os primeiros a precipitar (Mittelbach & Remschmidt *et al.*, 2004). No presente estudo, é possível observar uma baixa concentração de C18:0 nas biomassas, que reduz a temperatura de entupimento. No entanto, os problemas de operacionalidade, como sedimentação de cera e entupimento de filtros e tubulações de biocombustível, ocorrem em locais com temperaturas noturnas próximas a -10 e - 15 °C, não reduzindo a aplicabilidade do biodiesel obtido.

As normas europeias não estabelecem um padrão para esse parâmetro, no entanto, é recomendado por testes realizados medindo a capacidade de filtragem de biocombustíveis a baixa temperatura, ≤ 19°C. Assim, os resultados de todos os tratamentos não se enquadraram nos padrões estabelecidos pela UE. Ramos *et al.* (2009) avaliaram o CFPP do biodiesel de palma e observou que

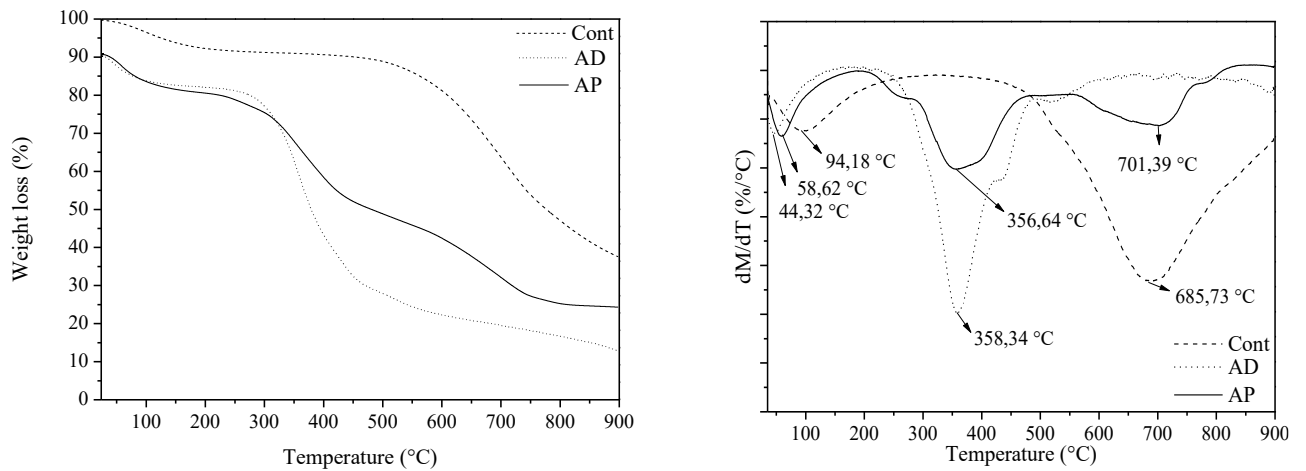
apresenta uma das maiores CFPP (10 °C), valor aproximadamente 12°C inferior ao tratamento AP. Segundo Schenk *et al.* (2008) um biodiesel de boa qualidade deve ser composto de uma proporção de biomassa de 5:4:1 de C16:1, C18:1 e C14:0, respectivamente, com baixo potencial oxidativo, mantendo boas características de fluxo frio e alta CN. Os tratamentos AP e AD alcançaram os valores estipulados, sendo o óleo de *Chlorella vulgaris* estudado, com qualidade desejável de propriedades de biodiesel.

### 3.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

Com base na formação dos eventos pronunciados nas curvas TG e DTG (Figura 4) é possível observar nas biomassas dos tratamentos e controle, segundo Gai *et al.* (2015) um primeiro estágio ocorre entre 50 a 180 °C, atribuída principalmente à remoção de água livre e desidratação. A perda de massa apresentada pela biomassa de *Chlorella vulgaris* nas faixas de temperatura foram AP (11,05%); AD (9,51%) e Controle (7,25%). Resultados próximos foram relatados por Li *et al.* (2017) na biomassa de *Tetraselmis suecica* sob diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>, ocorrendo uma diminuição lenta com 6% de perda de massa. Além disto, o processo de liofilização, retira grande quantidade de água, por esta razão, o evento térmico tem baixa intensidade. Segundo Jesus *et al.* (2018) o primeiro evento térmico da *Spirulina sp.* LEB 18 tem baixa intensidade devido ao baixo teor de umidade, provocado pelo processo de liofilização das amostras.

Na faixa de temperatura entre 180 e 500 °C, os tratamentos AP e AD, apresentaram grande perda de massa 46,34 e 69,38%, respectivamente. Visto que a biomassa de microalgas é composta por proteínas, carboidratos e lipídios, este evento está associado à decomposição térmica de macromoleculares orgânicos, como proteínas e polissacarídeos, e à produção de matéria volátil e carbono, que corresponderam ao principal estágio de decomposição térmica além da formação de carvões (Li *et al.*, 2017). Os resultados do presente estudo, estão de acordo ao relatado por Wuang *et al.* (2016), onde a principal faixa de degradação para microalgas é de 200 a 450 °C, onde seus

principais componentes são degradados.



**Figura 4.** Análise termogravimétrica da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG11 com adição de 50mL de água produzida (AP) e água destilada (AD) durante 26 dias. Curvas de TGA (a) e DTG (b).

É possível observar que o controle apresentou o segundo evento de degradação na faixa de 450 e 900 °C, pode estar relacionado ao alto teor de proteína comparado a AD e AP, que provoca uma junção dos eventos de degradação das macromoléculas (proteínas, carboidratos e lipídios) e cinzas. Além disto, os tratamentos AD e AP possuem maior teor de cinzas registrados a temperaturas superiores a 500 °C, provocando assim, uma junção dos eventos de cinzas com o carvão originado da combustão das macromoléculas. Segundo Andrade *et al.* (2019) eventos térmicos iniciando na faixa de 503,2 e 650,4 °C, é característico da decomposição de compostos residuais de carbono e compostos inorgânicos.

O tratamento AP apresentou 3 eventos térmicos na curva DTG, o perfil de combustão pode ser dividido em três estágios, ou seja, processo de desidratação (estágio I), desvolatilização e combustão (estágio II) e combustão de carvão (estágio III) (Ross *et al.*, 2010). A faixa de decomposição entre 500 e 900 °C é considerada uma decomposição adicional das ligações C-C e C-H (Aiman e Stubington *et al.*, 1993). Com a biorremediação a biomassa de AP, apresentam maior conteúdo de hidrocarbonetos, compostos com grande número de ligações (C-H) e (C-C). De acordo com Liu *et al.* (2019) a

biomassa de *Scenedesmus* após carbonização hidrotérmica, contém alto conteúdo dematériavolátild devido a abundância de carbono presente nos hidrocarbonetos, provocando combustão no estágio III.

#### 4. Conclusão

O cultivo de *Chlorella vulgaris* em água produzida apresentou significativa produção de biomassa, demonstrando boa adaptação da microalga em 50% de água produzida, valor alcançado no final do cultivo com alta eficiência de remoção de metais pesados além dos hidrocarbonetos totais. Aliando a síntese de biomoléculas de alto valor agregado, como principalmente carboidratos (40,19 %) que podem ser convertidos em bioetanol, além de concentrações de lipídios (21,53 %), comparado ao controle (21,37 %), juntamente com perfil de ácidos graxos e propriedades de biodiesel, adequados para a obtenção de um biodiesel de qualidade. Portanto, a biomassa obtida no tratamento AP, apresenta-se como uma alternativa promissora para além de biorremediar a água residual, ser uma fonte de biocombustíveis utilizando um efluente gerado pela própria indústria petrolífera.

#### Referências

- Abid, A., Saidane, F., Hamdi, M., 2017. Feasibility of Carbon dioxide sequestration by *Spongiochloris sp* microalgae during petroleum wastewater treatment in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*. 234, 297-302
- Aiman, S., Stubington, J., 1993. The pyrolysis kinetics of bagasse at low heating rates. *Biomass Bioenergy*. 5, 113–120
- Ammar, S. H., Khadim H. J., Mohamed, A. I., 2018. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*. 10, 132-142
- Andrade, B.B., Cardoso, L.G., Assis, D.J., Costa, J.A.V., Druzian, J.I., Lima, S.T.C., 2019. Production

and characterization of *Spirulina sp.* LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. *Bioresour Technol.* 284, 340–348

Ansilago, M., Ottonelli, F., Carvalho, E.M. Cultivation of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* in bench scale using medium contaminated with heavy metals. *Eng Sanit Ambient* v.21 n.3 p.603-608, 2016

Arriada, A. A., Abreu, P. C., 2014. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. 8, 119-125

Aslam, A., Thomas-hall, S.R., Mughal, T.A., Schenk, P.M., 2017. Selection and adaptation of microalgae to growth in 100% unfiltered coal-fired flue gas. *Bioresource Technology.* 233, 271-283

Bakke, T., Klungsøyr, J., Sanni, S., 2013. Environmental impacts of produced water and drilling waste discharges from the Norwegian offshore petroleum industry. *Marine Environmental Research.* 92, 154-169

Canedo-lópez, Y., Ruiz-marín, A., Zavala-loría, J.C., 2016. A two-stage culture process using *Chlorella vulgaris* for urban wastewater nutrient removal and enhanced algal lipid accumulation under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Renewable and Sustainable Energy.* 8, 033102

Cardoso, L.G., Duarte, J.H., Andrade, B.B., Lemos, P.V.L., Costa, J.A.V., Druzian, J.I., Chinalia, F.A., 2020. *Spirulina sp.* Leb 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: high biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. *Aquaculture.* 525, 735272

Cardoso, L.G., Duarte, J.H., Costa, J.A.V., Assis, D.A., Souza, C.O., Nunes, I.L., Andrade, B.B., Lemos, P.V.L., Costa, J.A.V., Druzian, J.I., Chinalia, F.A. 2020. *Spirulina sp.* as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel. *BioEnergy Research.*

Cakmakce, M., Kayaalp, n., Koyuncu, I., 2008. Desalination of produced water from oil production fields by membrane processes. *Desalination.* 222, 176–186

Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Baalen, C.V. Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. *Journal of General Microbiology*. V. 116, p.495-500, 1980

Chen, C.Y., Zhao, C.H., Yenc, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.G., Bai, F.W., Changa, J.S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*. 78, 1–10

Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J.S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2015. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. *Bioresource technology*. 184, 190-201

Collotta, M., Champagne, P., Mabee, W., Tomasonia, G., 2018. Wastewater and waste CO<sub>2</sub> for sustainable biofuels from microalgae. *Algal Research* 29, 12–21

Costa, J. A. V., Radmann, E. M., Cerqueira, V. S., Santos, G. C., Calheiros, M. N., 2006. Fatty acids profile the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* grown under different conditions. *Food and Nutrition*. 17, 429-436

Costa, J.A.V., Colla, L.M., Filho, D.P., Kabke, K., Weber, A., 2002. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 603–607

Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., Smith, A.G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*. 438, 90-93

Daneshvar, E., Antikainen, L., Koutrac, E., Kornarosc, M., Bhatnagara, A., 2018. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: treatment of wastewater and lipid extraction. *Bioresour. Technol.* 255, 104–110

Deshmukha, S., Kumar, S., Bala, K., 2019. Microalgae biodiesel: a review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Process Technol* 19, 232–247

Duarte, J.H., Cardoso, L.G., Souza, C.O., Nunes, I.L., Druzian, J.I., Morais, M.G., Costa, J.A.V., 2019. Brackish Groundwater from Brazilian Backlands in *Spirulina* Cultures: Potential of

Carbohydrate and Polyunsaturated Fatty Acid Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 190, 907 – 917

Evans, L., Hennigeb, S.J., Willoughby, N., Adeloyed, A.J., Skroblin, M., Gutierrez, T., 2017. Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*. 24, 368–377

Fakhru'l-razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L.C., Biak, D.R.A., Madaeni, S.S., Abidin, Z.Z., 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials*. 170, 530–551

Ferreira, A.F., Ribeiro, L.A., Batista, A.P., Marques, P.A.S.S., Nobre, B.P., Palavra, A.M.F., Silva, P.P., Gouveia, L., Silva, C., 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis* microalga – energy and CO<sub>2</sub> emission and economic analyses. *Bioresour. Technol.* 138, 235–244

Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal Chemical Technology Biotechnology*. 85, 395–403

Francisco, E.C., Franco, T.T., Manzon, M., 2015. Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas. *Ciência Rural*. 45, 349-355

Freitas, B.C.B., Cassuriaga, A.P.A., Morais, M.G., Costa, J.A.V., 2017. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. *Bioresour. Technol.* 238, 248-253

Folch, J., Lees, M., Sloane, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Aquastat, 2017. <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html?lang¼>

Fox, J.M., Zimba, P.V. Minerals and Trace Elements in Microalgae. *Microalgae in Health and*



Disease Prevention. p.177-193, 2018

Gai, C., Liu, Z., Han, G., Peng, N., Fan, A., 2015. Combustion behavior and kinetics of low-lipid microalgae via thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*. 181, 148–154

Gosh, S., Roy, S., DAS, D., 2017. Enhancement in lipid content of *Chlorella sp.* MJ 11/11 from the spent medium of thermophilic biohydrogen production process. *Bioresour. Technol.* 223, 219-226

Gondim, T., Guedes, J., Ribeiro, L., Lopes, G.S., Matos, W.O., 2017. Optimization of a cloud point extraction procedure with response surface methodology for the quantification of dissolved iron in produced water from the petroleum industry using FAAS. *Marine Pollution Bulletin*. 114, 2786-79130

Hamawand, I., Yusaf, T., Hamawand, S., 2014. Growing algae using water from coal seam gas industry and harvesting using an innovative technique: A review and a potential. *Fuel*. 117, 422–430

Ho, S.H., Chen, C., Lee, D., Chang, J., 2011. Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>- emissions mitigation systems – a review. *Biotechnol. Adv.* 29, 189–198

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: perspectives and Advances. *Plant J.* 54, 621–639

Huo, S., Chen, J., Zhu, F., Zou, B., Chen, X., Basheer, S., Cui, F., Qian, J., 2019. 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

Jaén-Gil, A., Ferrando-Climent, L., Ferrer, I., Thurman, E.M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Escudero-Oñate, C., 2020. Sustainable microalgae-based technology for biotransformation of benzalkonium chloride in oil and gas produced water: A laboratory-scale study. *Science of the Total Environment*. 748, 141526

Javed, F., Aslam, M., Rashid, N., Shamair, Z., Khan, A.L., Yasin, M., Fazal, T., Hafeez, A., Rehman, F., Rehman, M.S.U., Khan, Z., Iqbal, J., Bazmi, A.A., 2019. Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: A pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel* 255, 115826.

Jesus, C.S., Uebel, L.S., Costa, S.S., Miranda, A.L., Morais, E.G., Morais, M.G., Costa, J.A.V., Nunes, I.L., Ferreira, E.S., Druzian, J.I., 2018. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina sp.* LEB 18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. *Bioresour. Technol.* 256, 86–94

Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., Guo, R., 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. *ApplEnergy*. 88, 3336-3341

Knothe, G.H. Some aspects of biodiesel oxidative stability., 2006. *Fuel Process Technol.* 88, 669–677

Kulkarni, S., Nikolov, Z., 2018. Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research* 35, 185–193

Lam, M.K., Yusoff, I.G., Uemura, Y., Lim, J.W., Khoo, C.G., Lee, K.T., Ong, H.C., 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*. 103, 197-207

Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater, *Environ Pollut.* 89, 59–66

Lawton, R.J., Nys, R., Magnusson, M.E., Paul, N.A., 2015. The effect of salinity on the biomass productivity, protein and lipid composition of a freshwater macroalga. *Algal Res.*12, 213–220

Li, X., Yang, C., Zeng, G., Wu, S., Lin, Y., Zhou, Q., Zhong, Y., 2020. Nutrient removal from swine wastewater with growing microalgae at various zinc concentrations. *Algal Res.* 46, 101804

Li, F., Srivatsa, S.C., Batchelor, W., Bhattacharya, S., 2017. 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

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 4.3.1-4.3.8

Liu, F; Tu, T; Li, S; Cai, M; Huang, X; Zheng, F., 2019. Relationship between plankton-based b-carotene and biodegradable adaptability to petroleum-derived hydrocarbon. *Chemosphere*. 237, 124430

Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, L.O.S., Marquez, L.U., (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 3, 233-241

Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D., 2012. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2661–2670

Mata, S.N., Cardoso, L.G., Andrade, B.B., Duarte, J.H., Costa, J.A.V., Druzian, J.I., 2020. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a racewaytype bioreactor using wastewater from desalination process: production of carbohydrate-rich biomass. *Bioresour Technol.* 311, 123495

Matos, A., Moecke, E.H.S., Sant'anna, E.S., 2017. The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil. *Algal Res.* 24, 505–508

Mittelbach, M., Remschmidt, C., 2004. *Biodiesel – The Comprehensive Handbook*. Boersdruck GmbH, Graz, Austria.

Motta, A.R.P., Borges, C.P., Kiperstok, A., Esquerre, K.P., Araujo, P.M., Branco, LP.N., 2013. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão. *EngSanit Ambient.* 18, 15-26

Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* 40, 2799–2815

Nascimento, I.A., Marques, S.SI., Cabanelas, I.T.D., Carvalho, G.C. Nascimento, M.A., Souza, C.O., Druzian, J.I., Hussain, J., Liao, W., 2014. Microalgae versus land crops as feedstock for biodiesel: productivity, quality and standard compliance. *Bioenerg. Res.* 7, 1002–1013

Nascimento, I.A., Marques, S.SI., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J.I., Souza, C.O., Vich,

D.V., Carvalho, G.C., Nascimento, M.A., 2013. 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

Nasir, N.M., Bakar, N.S.A., Lananan, F., Hamid, S.H.A., Lam, S.A., Jusoh, A., 2015. Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting. 190, 492-498

Niccolai, A., Zittellib, G.C., Rodolfia, L., Biondia, N., Tredicia, M.R., 2019. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research* 42, 101617

Nie, X., Mubashar, M., Zhang, S., Qin, Y., Zhang, X., 2020. Current Progress, Challenges and Perspectives in Microalgae-based Nutrient Removal for Aquaculture Waste: A Comprehensive Review. 227, 124209

Otondo, A., Kokabian, B; Stuart-dahl, S., Gude, V., 2018. Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical*. 6, 3213-3222

Park, Y., Je, K.-W., Lee, K., Jung, S.-E., Choi, T.-J. 2008. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia*, 598, 219-228

Petróleo Brasileiro S/A (Petrobras). (2017) Água na Petrobras. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/lumis/portal/file/fileDownload.jsp?fileId=8A193576621AF7E00162449D75854954>>. Acessado em: 02 agost. 2020

Piligayev, A.V., Sorokina, K.N., Bryanskaya, A.V., Peltek, S.E., Kolchanov, N.A., Parmon, V.N., 2015. Isolation of prospective microalgal strains with high saturated fatty acid content for biofuel production. *Algal Research* 12, 368–376

Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á., 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* 100, 261–268

RAMSUNDAR, P. ABHISHEK G. SINGH P. PILLAY, K. BUX, F. Evaluation of waste activated sludge as a potential nutrient source for cultivation of *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, v. 28, p. 108-117, 2017

- Ross, A.B., Biller, P., Kubacki, M.L., Li, H., Jones, J.M., 2010. Hydrothermal processing of microalgae using alkali and organic acids. *Fuel*. 89, 2234–43
- Rosa, G.M., Moraes, I., Cardias, B.B., Souza, M.R.A.Z., Costa, J.A.V., 2015. Chemical absorption and CO<sub>2</sub> biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. *Bioresource Technology*. 192, 321–327
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1, 20-43
- Sforza, E., Kumkumb, P., Barbera, E., Kumar, S. Bioremediation of industrial effluents: How a biochar pretreatment may increase the microalgal growth in tannery wastewater. *Journal of Water Process Engineering*. V. 37, p.101431, 2020
- Shahi, A., Aydin, S., Ince, B., Ince, O., 2016. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*. 306, 60–66
- Silva, C.E.F., Bertucco, A., 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. *Process Biochem*. 51, 1833–1842
- Tripathi, R., Singh, J., Thakur, I.S., 2015. Characterization of microalga *Scenedesmus sp.* ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. *Renew. Energy*. 74, 774–781
- Wang, M., Kuo-Dahab, W.C., Dolan, S., Park, S., 2014. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella sp.* and *Micractinium sp.* in wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 154, 131–137
- Wuang, S.C., Khin, M.C., Chua, P.Q.D., Luo, Y.D., 2016. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Res*. 15, 59–64
- Yun, C.J., Hwang, S.S.H., Ri, H.G., 2019. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and Bioenergy*. 127, 105277

Zhang, Y., Su, H., Zhong, Y., Zhang, C., Shen, Z., Sang, W., Yan, G., Zhou, X., 2012. The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products. *Water Res.* 46, 5509–5516

Xu, M., Sheng, C., 2012. Influences of the heat-treatment temperature and inorganic matter on combustion characteristics of cornstalk biochars. *Energy Fuels.* 26, 209–18.

Xu, D., Wang, Y., Lin, G., Guo, S., Wang, S., Wu, Z., 2019. Co-hydrothermal liquefaction of microalgae and sewage sludge in subcritical water: Ash effects on bio-oil production. *Renewable Energy.* 138, 1143e1151

Zhang, Z., Gao, P., Guo, L., Wang, Y., She, Z., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., Wang, G., 2020. Elucidating temperature on mixotrophic cultivation of a *Chlorella vulgaris* strain: different carbon source application and enzyme activity revelation. *Bioresource Technology.* 314, 123721

Zhigang, G.E., Hui, Z., Yuejin., Cheng, Y., Yongjun, Z., Purifying synthetic high-strength wastewater by microalgae *Chlorella vulgaris* under various light emitting diode wavelengths and intensities. *Journal of Environmental Health Science and Engineering.* v.11, p.8 2013

Znad, H., al ketife, A.M.D., Judd, S., Almomanid, F., Vuthaluru, H.B. Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering.* v.110, p.1–7, 2018