

---

PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, USP E UNICAMP) DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

---

SISTEMAS SUSTENTÁVEIS DE CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS*  
A PARTIR DE EFLUENTES DE AQUICULTURA

**CHARLENE RAQUEL DE ALMEIDA VIANA**

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioenergia.

Orientador: **Ricardo Alan Verdú Ramos**

**Dezembro, 2020.**

---

PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, USP E UNICAMP) DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

---

**SISTEMAS SUSTENTÁVEIS DE CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS*  
A PARTIR DE EFLUENTES DE AQUICULTURA**

**CHARLENE RAQUEL DE ALMEIDA VIANA**

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioenergia.

Orientador(a): **Ricardo Alan Verdú Ramos**

Rio Claro (SP)

2020

V614s Viana, Charlene Raquel de Almeida  
Sistemas sustentáveis de cultivo de *Chlorella vulgaris* a partir  
de efluentes de aquicultura. / Charlene Raquel de Almeida  
Viana. -- Rio Claro, 2020  
111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Rio Claro  
Orientador: Ricardo Alan Verdú Ramos

1. Biomassa. 2. *Chlorella vulgaris*. 3. Ranicultura. 4.  
Piscicultura. 5. Lipídeos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do  
Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: **SISTEMAS SUSTENTÁVEIS DE CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* A PARTIR DE EFLUENTES DE AQUICULTURA**

AUTORA: **CHARLENE RAQUEL DE ALMEIDA VIANA**

ORIENTADOR: **RICARDO ALAN VERDÚ RAMOS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOENERGIA, área: Motores e Biocombustível, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RICARDO ALAN VERDÚ RAMOS (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Mecânica / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP



Prof. Dr. CELSO EDUARDO TUNA (Participação Virtual)  
Departamento de Química e Energia / Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá - UNESP



Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES (Participação Virtual)  
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP



Prof. Dr. ELIAS TREVISAN (Participação Virtual)  
Centro de Tecnologia / Universidade Estadual de Maringá



Dra. VANESSA DA SILVEIRA RAMOS (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Rio Claro, 21 de dezembro de 2020.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Helena.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me dado força, saúde e sabedoria.

Ao meu marido Ronaldo pelo apoio, compreensão e amor.

Aos meus pais Wilson e Eunice e aos meus irmãos Fabrício e Cesar por terem acreditado em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Alan Verdú Ramos pela oportunidade de realizar o doutorado, apoio, amizade e conhecimento compartilhado.

A todos os professores do Doutorado em Bioenergia, que compartilharam seus conhecimentos durante esta jornada.

Aos meus tios, tias e primos.

Aos amigos do Laboratório da Unesp de Dracena, Bruno, Marcela, Gabriela e Camila.

Aos técnicos do Laboratório da UNESP – Câmpus de Dracena, Miriam, Andréia, Lucas, Edson, Eloisa, Wanderson e Ariane, que por inúmeras vezes me atenderam prontamente.

Ao Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi, do Departamento de Produção Animal da FCAT da UNESP – Câmpus de Dracena, por ter gentilmente fornecido o efluente de aquicultura.

À Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini, do Departamento de Botânica da UFSCar, pelo envio da cepa de microalga foco deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Para que, como está escrito:  
Aquele que se gloria,  
gloria-se no senhor.  
(1 Coríntios, 1:31).

## RESUMO

A busca por estratégias destinadas ao reaproveitamento de nutrientes gerados por efluentes de água de aquicultura tem crescido, como também estudos para sua utilização em cultivos de microalgas que possuem alto potencial de absorção desses nutrientes. Dentre as opções de aquicultura, existem poucos trabalhos com águas de piscicultura e ranicultura para produção de microalgas. Assim, a integração do meio de cultura e da diluição dessas águas de aquicultura para o cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobioreatores foi o aspecto a ser considerado no presente estudo. As condições para o ensaio foram os meios Illman, águas residuárias de piscicultura de baixa densidade (APBD), águas residuárias de piscicultura de alta densidade (APAD) e águas residuárias de ranicultura (AR), concentrando-os a 5, 20, 35 e 50 %; no esquema fatorial 4 x 4, ou seja água de aquicultura com as diferentes concentrações, em triplicata para reduzir erros sistemáticos e garantir reprodutibilidade ao estudo. Foram monitorados parâmetros que influenciam o cultivo das microalgas (pH, amônia, turbidez e clorofila) e analisados parâmetros de desempenho do cultivo (biomassa seca, lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas). Foi verificado que o efluente de aquicultura diluído é uma via eficiente para o cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* em fotobioreatores. O cultivo de microalga em APBD otimizou a produção de proteínas na concentração de 50 %, viabilizando a fabricação de alimentos funcionais e rações para animais. A AR na concentração de 5%, é um meio, com boa potencialidade de produção de hidratos de carbono, substratos de industrialização de bioetanol, biogás e bioprodutos de valor agregado. APAD a 5 % e AR a 20 % maximizaram produção de biomassa seca, 0,35 e 0,40 mg/l, respectivamente. Os maiores teores de lipídeos totais (29,50 e 26,10 %, respectivamente) foram obtidos nos meios Illman a 35 % e APBD a 5 %. A melhor opção de substrato alternativo à produção de material graxo para a produção de biodiesel de terceira geração seria APAD. Assim, foi comprovado que a diluição, em conjunto com o meio de cultivo, pode reduzir tanto a toxicidade como a turbidez do efluente, assegurando, ao mesmo tempo, tanto a exequibilidade como a viabilidade do efluente de aquicultura como um meio alternativo para maximizar a produção de biomassa coletável e, conseqüentemente, de lipídeos, proteínas e clorofilas, para potencialmente produzir biocombustíveis de terceira geração, rações e produtos químicos finos.



**Palavras-chave:** Biomassa. *Chlorella vulgaris*. Ranicultura. Piscicultura. Lipídeos. Proteínas.

## ABSTRACT

The search for strategies aimed at recycling nutrients generated from aquaculture water effluent has been growing, as well as studies with cultivation of microalgae which have high absorption potential of these nutrients. Among aquaculture options, there are few studies that use fish and ranch waters for the production of microalgae. The concept of integration of the culture medium and the dilution these aquaculture waters for the culture of *Chlorella vulgaris* in photoreactors is, therefore, the scientific point of this study. The conditions for the test were: the mediums Illman, Residual waters from low-density fish farming (APBD), Residual waters from high-density fish farming (APAD) and Residual waters from ranching (AR), concentrating them at 5, 20, 35 and 50 %; in the 4 x 4 factorial scheme, i.e., aquaculture water and concentrations in triplicate, to reduce systematic errors and ensure reproducibility of the study. Parameters that influence the cultivation of microalgae (pH, ammonia, turbidity and chlorophylls) were monitored and parameters of microalgae culture (dry biomass, lipids, carbohydrates, proteins and ashes) were determined. The cultivation of microalgae in APBD optimized the production of proteins at a concentration of 50% enabling the manufacture of functional foods and animal feed. The AR at a concentration of 5%, is a medium with good potential for the production of carbohydrates, substrates for bioethanol industrialization, biogas and value-added bioproducts. APAD at 5% and AR at 20% maximized dry biomass production, 0,35 and 0,40 mg/l, respectively. The highest levels of total lipids (29.50 and 26.10%, respectively) were obtained in Illman media at 35% and APBD at 5%. The best alternative substrate option to the production of fatty material for the production of third generation biodiesel would be APAD. Thus, it has been proven that dilution, together with the culture medium, can reduce both toxicity and turbidity of the effluent, while ensuring both the feasibility and viability of the aquaculture effluent as an alternative means to maximize the production of collectable biomass and, consequently, of lipids, proteins and chlorophylls, to potentially produce third generation biofuels, feed and fine chemicals.

**Keywords:** Biomass. *Chlorella vulgaris*. Ranch water. Freshwater. Lipids. Proteins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produtos e subprodutos possíveis de serem obtidos a partir da biomassa.....	19
Figura 2 – Etapas de extração de produtos a partir de microalga.....	20
Figura 3 – Micrografias de alguns tipos de microalgas.....	21
Figura 4 – Foto de um cultivo de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> .....	22
Figura 5 – Esquema de mecanismo da conversão de energia solar em energia química por fotossíntese.....	25
Figura 6 – Curva típica de crescimento celular (linha contínua) e concentração de nutrientes (linha tracejada).....	27
Figura 7 – Estrutura celular e metabolismo de microalga pelo hábito de crescimento.....	28
Figura 8 – Diferenças entre os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos.....	29
Figura 9 – Lagoas fotossintéticas do tipo <i>raceway ponds</i> .....	33
Figura 10 – Produtividade relativa de biomassa de microalga cultivada em fotobioreatores em comparação com outros processos.....	34
Figura 11 – Esquematização de um tanque agitador.....	35
Figura 12 – Fotobioreator tubular vertical.....	35
Figura 13 – Esquematização de fotobioreator tubular vertical de coluna de bolhas..	36
Figura 14 – Esquematização de fotobioreator tubular vertical de elevação de ar .....	37
Figura 15 – Esquematização de fotobioreator tubular horizontal.....	37
Figura 16 – Esquematização do fotobioreator de painel plano.....	38
Figura 17 – Dependência entre a eficiência fotossintética e a intensidade da radiação luminosa.....	43
Figura 18 – Multiplicação das células em meio Illman.....	54
Figura 19 – Fluxograma da etapa de preparo da cepa e do inóculo.....	55
Figura 20 – Local de coleta de efluentes no sistema de piscicultura e ranicultura....	56
Figura 21 – Estante de metal, com circuito de iluminação artificial fluorescente .....	58
Figura 22 – Contagem celular.....	58
Figura 23 – Fluxograma do cultivo de microalga em água de aquicultura.....	59
Figura 24 – Foto do pHmetro utilizado nos experimentos.....	60

Figura 25 – Foto do espectrofotômetro utilizado nos experimentos .....	60
Figura 26 – Foto do espectrofotômetro UV-vis utilizado nos experimentos.....	61
Figura 27 – Parte do processo para determinação do teor de clorofila .....	62
Figura 28 – Filtragem das amostras .....	63
Figura 29 – Coleta de biomassa microalgal por centrifugação.....	64
Figura 30 – Secagem e trituração de biomassa microalgal.....	65
Figura 31 – Sistema para quebra de células por meio de ultrassom.....	66
Figura 32 – Características do pH em função do tempo de cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	71
Figura 33 – Características da amônia em função do tempo de cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	71
Figura 34 – Características da turbidez em função do tempo de cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	72
Figura 35 – Produção de biomassa seca em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	75
Figura 36 – Porcentagem de lipídeo em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	76
Figura 37 – Porcentagem de Carboidratos em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	76
Figura 38 – Porcentagem de proteínas em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	77
Figura 39 – Porcentagem de clorofila em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	80
Figura 40 – Porcentagem de cinzas em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.....	81
Figura 41 – Relações lineares entre propriedades do meio e variáveis de desempenho de cultivo de microalga em águas de aquicultura .....	82
Figura 42 – Monitoramento do pH no meio de cultivo em diferentes diluições.....	107
Figura 43 – Monitoramento da absorbância no meio de cultivo em diferentes diluições.....	107
Figura 44 – Monitoramento da concentração de amônia no meio de cultivo em diferentes diluições.....	108
Figura 45 – Monitoramento da concentração de nitrato no meio de cultivo em diferentes diluições.....	108

Figura 46 – Monitoramento da concentração de nitrito no meio de cultivo em diferentes diluições.....	109
Figura 47 – Monitoramento do crescimento celular no meio de cultivo em diferentes diluições.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de substratos oleaginosos de microalgas.....	23
Tabela 2 – Grupos de microalgas pelo potencial de acúmulo de lipídeos.....	24
Tabela 3 – Grupos de microalgas pela velocidade de crescimento.....	26
Tabela 4 – Características de modos de cultivo microalgal.....	30
Tabela 5 – Percentual de ácidos graxos em biomassa de <i>C. vulgaris</i> por fator de diluição de água residuária de laticínio.....	40
Tabela 6 – Principais características dos métodos de colheita de biomassa microalgal .....	47
Tabela 7 – Condições operacionais de colheita de biomassa algácea por centrifugação.....	48
Tabela 8 – Eficiência de extração de lipídeos por solventes .....	52
Tabela 9 – Propriedades nutricionais de meio Illman.....	54
Tabela 10 – Descrição dos tratamentos com os meios de cultivo.....	57
Tabela 11 – Análise de superfície-resposta de propriedades físico-químicas de meio de cultivo e fonte de água de aquicultura.....	70
Tabela 12 – Análise de superfície-resposta de desempenho do cultivo de microalgas pela fonte e concentração de água de aquicultura .....	74
Tabela 13 – Análise de regressão linear múltipla de produção de biomoléculas por propriedades físico-químicas de meio de cultivo alternativo de microalga.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>APAD</i>	Água residuária de piscicultura de alta densidade
<i>APBD</i>	Água residuária de piscicultura de baixa densidade
<i>AR</i>	Água residuária de ranicultura
<i>Bs</i>	Biomassa seca
<i>Cz</i>	Teor de cinza
<i>C</i>	Teor de carboidratos
<i>Ca</i>	Clorofila
<i>Lt</i>	Lipídeo total
<i>M</i>	Massa molar
<i>Ma</i>	Massa de filtro com amostra
<i>Mf</i>	Massa de filtro seco
<i>Mo</i>	Massa inicial de amostra
<i>M1</i>	Massa final de amostra
<i>P</i>	Constante de proporcionalidade
<i>P</i>	Teor de proteína
<i>V</i>	Volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA DO TEMA .....	18
2.2 BIOLOGIA, ECOLOGIA E DIVERSIDADE DE MICROALGAS.....	21
2.3 CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO .....	24
2.4 CULTIVO DE MICROALGAS .....	28
<b>2.4.1 Modalidades de Cultivo</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4.1.1 Cultivo Autotrófico</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.1.2 Cultivo Heterotrófico</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.1.3 Cultivo Mixotrófico</b> .....	<b>31</b>
2.5 SISTEMAS DE CULTIVO .....	31
<b>2.5.1 Lagoas Recirculativas</b> .....	<b>32</b>
<b>2.5.2 Fotobioreatores</b> .....	<b>33</b>
<i>2.5.2.1 Tanque Agitador</i> .....	<i>34</i>
<i>2.5.2.2 Tubular Vertical</i> .....	<i>35</i>
<i>2.5.2.2.1 Coluna de Bolha</i> .....	<i>35</i>
<i>2.5.2.2.2 Elevação de Ar (Airlift)</i> .....	<i>36</i>
<i>2.5.2.3 Tubular Horizontal</i> .....	<i>37</i>
<i>2.5.2.4 Painel Plano</i> .....	<i>38</i>
2.6 UTILIZAÇÃO DE EFLUENTE COMO MEIO ALTERNATIVO.....	38
2.7 FATORES QUE INFLUENCIAM O CULTIVO.....	40
<b>2.7.1 Nutrição</b> .....	<b>41</b>
<b>2.7.2 Iluminação Artificial</b> .....	<b>41</b>
<b>2.7.3 Temperatura</b> .....	<b>43</b>
<b>2.7.4 pH</b> .....	<b>43</b>
<b>2.7.5 Nitrogênio</b> .....	<b>45</b>
<b>2.7.6 Agitação</b> .....	<b>45</b>
2.8 COLHEITA DE MICROALGAS.....	46
<b>2.8.1 Colheita por Centrifugação</b> .....	<b>47</b>
<b>2.8.2 Colheita por Biofloculação</b> .....	<b>49</b>
2.9 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS .....	49



<b>2.9.1 Solventes Orgânicos</b> .....	<b>50</b>
2.9.1.1 Sistema Bligh-Dyer.....	50
2.9.1.2 Sistema Folch.....	51
2.9.1.3 Sistema Folch-Bligh-Dyer.....	51
<b>2.9.2 Solventes Superiores</b> .....	<b>51</b>
<b>2.9.3 Solventes Eutéticos</b> .....	<b>52</b>
<b>2.9.4 Líquidos Iônicos e Fluidos Supercríticos</b> .....	<b>52</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
3.1 CULTURA DE MICROALGA .....	54
3.2 COLETA DE EFLUENTES .....	55
3.3 CULTIVO E COLHEITA.....	56
3.4 ANÁLISE QUANTITATIVA .....	59
<b>3.4.1 Monitoramento do pH</b> .....	<b>59</b>
<b>3.4.2 Monitoramento de Nitrogênio Amoniacal</b> .....	<b>60</b>
<b>3.4.3 Determinação de Turbidez</b> .....	<b>60</b>
<b>3.4.4 Monitoramento de Concentração de Clorofila</b> .....	<b>61</b>
<b>3.4.5 Determinação de Biomassa Seca</b> .....	<b>62</b>
3.5 RECUPERAÇÃO E SECAGEM DA BIOMASSA.....	63
3.6 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SECA.....	65
<b>3.6.1 Determinação de Lipídeos Totais</b> .....	<b>65</b>
<b>3.6.2 Determinação do Teor de Proteína</b> .....	<b>66</b>
<b>3.6.3 Determinação do Teor de Cinzas</b> .....	<b>67</b>
<b>3.6.4 Determinação do Teor de Carboidratos</b> .....	<b>67</b>
3.7 ANÁLISE DE DADOS.....	67
<b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
4.1 PROPRIEDADES DO SUBSTRATO.....	69
4.2 DESEMPENHO TÉCNICO DE CULTIVO .....	73
4.3 ASSOCIAÇÕES DE PROPRIEDADES DE SUBSTRATO E VARIÁVEIS DE DESEMPENHO DE CULTIVO.....	81
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>
<b>APÊNDICE A – TESTES PRELIMINARES REALIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E DILUIÇÕES</b> .....	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Petróleo, gás natural e carvão mineral são as principais fontes de energia fóssil globais. Explorá-las irracionalmente é, todavia, improvável ao desenvolvimento socioeconômico-demográfico sustentável de unidades federativas. A extração em reservatórios naturais de recursos não-renováveis, principalmente petrolíferos, progride geometricamente; revertê-la artificialmente é praticamente impossível. Microalgas seriam, portanto, alternativa perspicaz à produção e resolução parcial de crises energéticas (GUMBI *et al.*, 2017; HEO *et al.*, 2017).

O desenvolvimento e crescimento das microalgas podem ser de forma autotrófica, heterotrófica e/ou mixotroficamente, onde a produtividade e a qualidade de biomassa são influenciadas por contaminantes microbianos, CO<sub>2</sub>, fotoperíodo, minerais, O<sub>2</sub>, pH, radiação solar, salinidade e temperatura. Já os meios de cultivo consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos fora do seu meio natural. Esses meios devem suprir todas as necessidades nutritivas do microrganismo para síntese do material celular e a produção de metabólitos de interesse industrial (DENG *et al.*, 2018; GHIMIRE *et al.*, 2017; SINGH; SINGH, 2014; WONG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; ANDRADE, FILHO-COLOZZI, 2014).

Há possibilidade de cultivo de microalgas em lagoas e/ou fotobioreatores para produção de produtos de valor agregado que, frequentemente, superam culturas de canola, coco, palma, pinhão-manso e soja, em termos de produtividade. Todavia, consomem significantes quantidades de água-doce e fertilizantes sintéticos. Efluentes agropecuários (da bovinocultura, suinocultura, aquicultura, dentre outros) seriam, contextualmente, opções à ficologia industrial (ARCHANAA *et al.*, 2019; GIRALDO CALDERÓN; DÍAZ BAYONA; ATEHORTÚA GARCÉS, 2018).

Microalgas são, conceitualmente: organismos fitoplanctônicos unicelulares. Componentes dominantes de microflora capturam energia física de raios solares ou, eventualmente, iluminação artificial, estocando-a e convertendo-a, metabolicamente, em biomassa, absolutamente recuperável e processável. Os principais elementos de material algáceo são: carboidratos, lipídeos, proteínas, pigmentos e minerais. Hidratos de carbono são, tecnicamente, viáveis à industrialização de biogás e biopolímeros,

enquanto metabólitos proteicos e lipídicos, são flexíveis ao biorrefino de alimentos funcionais e biodiesel, respectivamente (WONG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017).

As aplicações do uso das microalgas são as mais variadas, das mais simples às mais complexas. Dessa forma, esses micro-organismos despertam grande interesse na mitigação de impactos ambientais. Existem pesquisas nas últimas décadas centradas principalmente na exploração de microalgas para a extração de produtos de valor comercial e, também, para utilização em sistemas de tratamento de águas residuais (WUANG *et al.*, 2016). Nesta última aplicação, elas retiram os nutrientes e os metais pesados e, posteriormente, a sua biomassa ser utilizada para outras aplicações industriais e agrícolas (LOURENÇO, 2006).

As microalgas podem apresentar um grande potencial no tratamento de efluentes por necessitarem de nutrientes como nitrogênio e fósforo, permitindo a manutenção da água nos próprios tanques de piscicultura, por exemplo, onde os mesmos apresentarem uma alta taxa desses compostos resultantes das excretas dos peixes. Sendo assim, o conhecimento da cinética de crescimento ou duplicação celular das microalgas em tanques de piscicultura torna-se um importante elemento para assegurar novos conhecimentos e, conseqüentemente, agregar qualidade à produtividade do pescado e ao meio ambiente. No entanto, para uma ótima operação de um sistema de remediação de águas residuais com microalgas é necessária uma análise cuidadosa do método mais eficiente de cultivo e determinação das espécies mais adequadas para esse propósito (MCGINN *et al.*, 2012; LOURENÇO, 2006; BORGES *et al.*, 2000).

Diante deste contexto, o objetivo geral do estudo é cultivar as microalgas para produção de biomassa em efluentes de aquicultura, visando posterior produção de subprodutos, tendo como objetivos específicos os seguintes:

1. Testar técnicas de cultivo visando à maximização do potencial da microalga *Chlorella vulgaris* e aumento da produtividade da biomassa e lipídeos em água residuais de piscicultura e ranicultura;
2. Promover a biorremediação dos nutrientes presentes em efluentes de aquicultura;
3. Avaliar as potencialidades da utilização da biomassa residual.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir será apresentada uma revisão de literatura, destacando aspectos gerais sobre microalgas e sua importância; biologia, ecologia e diversidade de microalgas; crescimento e desenvolvimento; meios e sistemas de cultivo; utilização de efluente como meio alternativo; estratégias de indução de lipídeos; colheita; e extração de lipídeos.

### 2.1 ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA DO TEMA

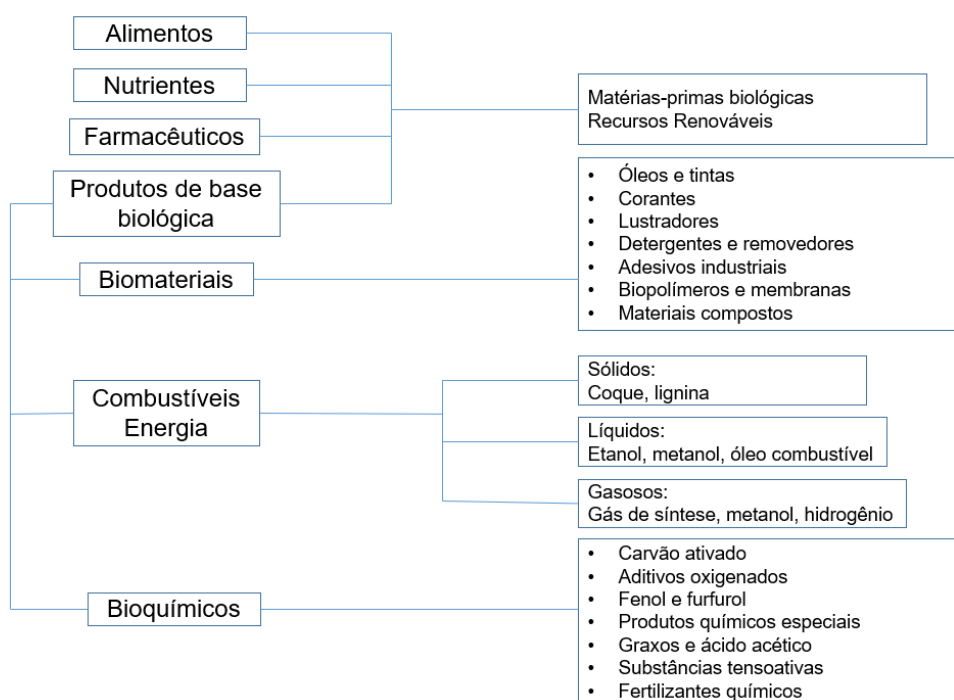
O consumo energético global progride vertiginosamente, sendo que a urbanização e a superpopulação são fatores propulsores. Os recursos fósseis (petróleo, gás natural e carvão mineral) são fundamentais ao desenvolvimento socioeconômico demográfico, mas explorá-los intensamente é questionável e dilemático. Desenvolvimento e implementação de biocombustíveis sustentáveis e renováveis é questão-chave à segurança energética (DRIRA *et al.*, 2016; GUMBI *et al.*, 2017; HEO *et al.*, 2017; MARANDUBA *et al.*, 2016; PANDIT; FULEKAR; WAN GHAZALI *et al.*, 2015; XAALDI KALHOR *et al.*, 2016).

Microalgas são fundamentais à biofixação de CO<sub>2</sub> e redução parcial da poluição atmosférica. Especialistas as qualificam como mecanismo para a consolidação da agricultura de Carbono Neutro e concessão de linhas de crédito às empresas ecologicamente responsáveis. Existem, portanto, oportunidades de negócio pelo incomparável potencial de sequestro de CO<sub>2</sub> de microalgas, aplicáveis à produção de biocombustíveis (GE *et al.*, 2017; GREENWELL *et al.*, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015; PANDIT; FULEKAR; SUN *et al.*, 2014; SUTHAR; VERMA, 2018).

A biotecnologia das microalgas possui inúmeras possibilidades de geração de subprodutos, sendo que atualmente são utilizadas diversas espécies nas mais variadas aplicações, tais como: alimentação para animais e humanos, biofertilizantes de solo, biocombustíveis (biobutanol, bioetanol, biohidrogênio, biogás e bio-óleo); bioquímicos finos (ácido succínico, poliésteres, propanodiol, etc...) e bioprodutos (ácidos graxos de cadeia longa, antibióticos, pigmentos, polipeptídios, polissacarídeos) (GHIMIRE *et al.*, 2017; GUPTA; LEE; CHOI, 2015; UMMALYMA *et al.*, 2017; XIA *et al.*, 2016; LOURENÇO, 2006).

A Figura 1 apresenta um esquema de uma biorrefinaria de microalgas, fundamentada em aplicação de tecnologias à conversão fracionada de biomassa em produtos e subprodutos de valor agregado (KAMM; KAMM, 2004).

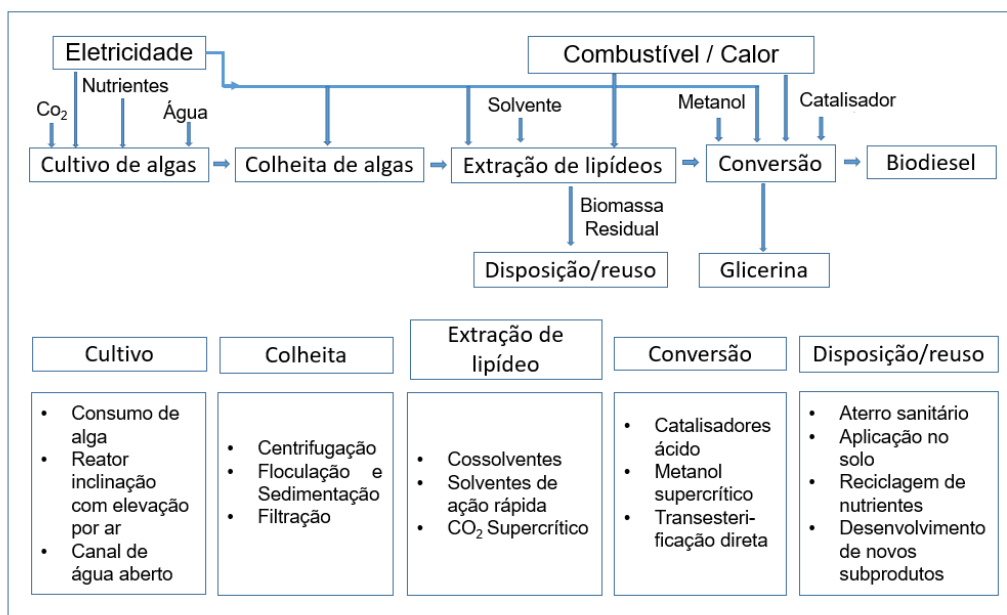
Figura 1. Produtos e subprodutos possíveis de serem obtidos a partir da biomassa.



Fonte: Adaptado de Kamm; Kamm (2004).

Nos processos de produção de quaisquer produtos desejáveis através de microalga é necessário que haja uma estabilização do cultivo, iniciando-se desta forma com a seleção das espécies e a implementação do sistema de cultivo. Em seguida, após crescimento da cultura, a biomassa é colhida e processada para a extração dos produtos, como pode ser observado na Figura 2 (BRENTNER; BECKELMAN; ZIMMERMAN, 2010).

Figura 2. Etapas de extração de produtos a partir de microalga.



Fonte: Adaptado de Brentner; Beckelman; Zimmerman (2010).

A produção de microalgas pelo fornecimento de efluente e/ou gás de combustão, ao invés de água-doce e/ou CO<sub>2</sub> (insumo antieconômico), convencionalmente aliviaria prováveis impactos de emissões industriais e disposição de resíduos em ecossistemas naturais, aquáticos, terrestres e aéreos. A integração de cultivo comercial à fitoremediação preservaria o ambiente e, simultaneamente, economizaria custos de gestão de estações de tratamento de dejetos (DENG *et al.*, 2018; SALAMA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2011).

Devido à limitação de crescimento das microalgas com o aumento e diminuição de compostos como nitrogênio e fósforo, elas são muito utilizadas no tratamento e reutilização de efluentes de águas residuais domésticas, agroindustriais e agropecuárias (bovinocultura, suinocultura e aquicultura, em especial na água de piscicultura que uma alta taxa desses compostos resultantes das excretas dos peixes e decomposição dos restos de rações não consumidas) (LOURENÇO, 2006; BORGES *et al.*, 2000).

## 2.2 BIOLOGIA, ECOLOGIA E DIVERSIDADE DE MICROALGAS

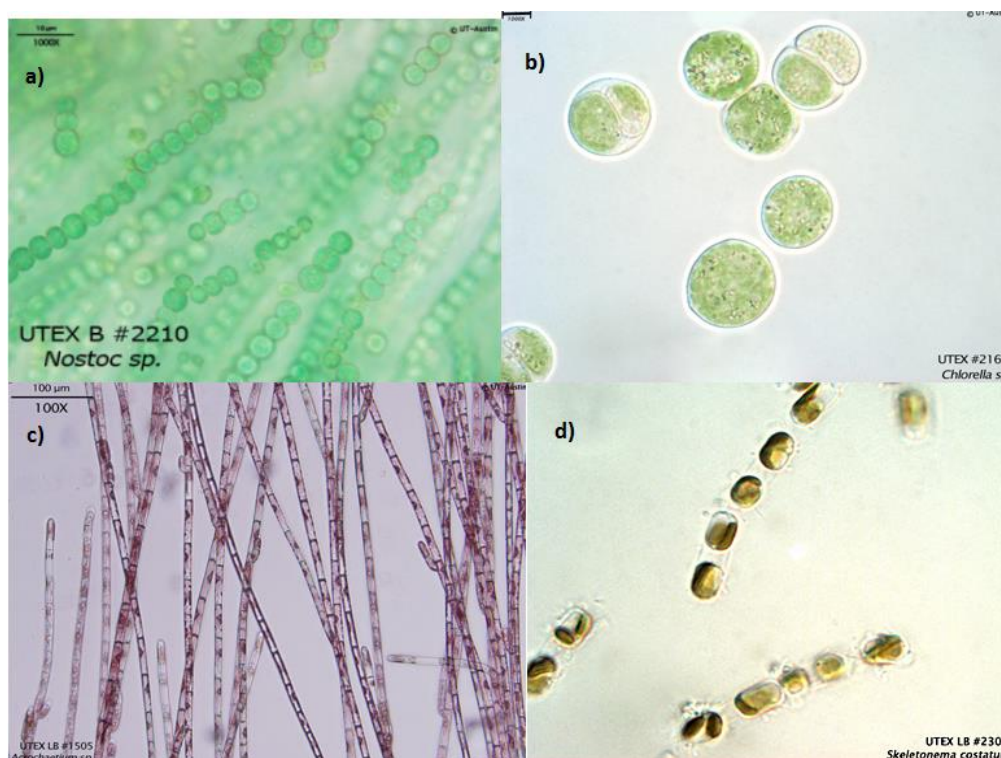
As microalgas são encontradas em ambiente marinho, dulcícola e no solo, sendo responsáveis por pelo menos 60% da produção primária de oxigênio no planeta

(CHISTI, 2007). Elas pertencem a um grupo de organismos muito diversos e importantes, podendo ser cultivadas em laboratório, de acordo com a especificidade de cada espécie.

Basicamente, microalgas são organismos fotossintéticos, geralmente microscópicos e unicelulares, que podem formar colônias com pouca ou nenhuma diferenciação celular, sendo caracterizadas pela presença de pigmentos astaxantina, carotenoide, clorofila, ficobilina e ficocianina, típicos em cianofíceas e rodofíceas, (SINGH; SINGH, 2014).

As classes de cianobactérias são: algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*), cianofíceas (*Cyanobacteria*) e diatomáceas (Bacilariofícea), as quais podem ser vistas na Figura 3. A biodiversidade e a irrestrita adaptabilidade fisiográfica possibilitam a exploração comercial em lagoas *raceway* e/ou fotobioreatores, sendo importantes ecológica e economicamente (GHIMIRE *et al.*, 2017; GUPTA; LEE; CHOI, 2015; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015; SINGH; SINGH, 2014).

Figura 3. Micrografias de alguns tipos de microalgas.

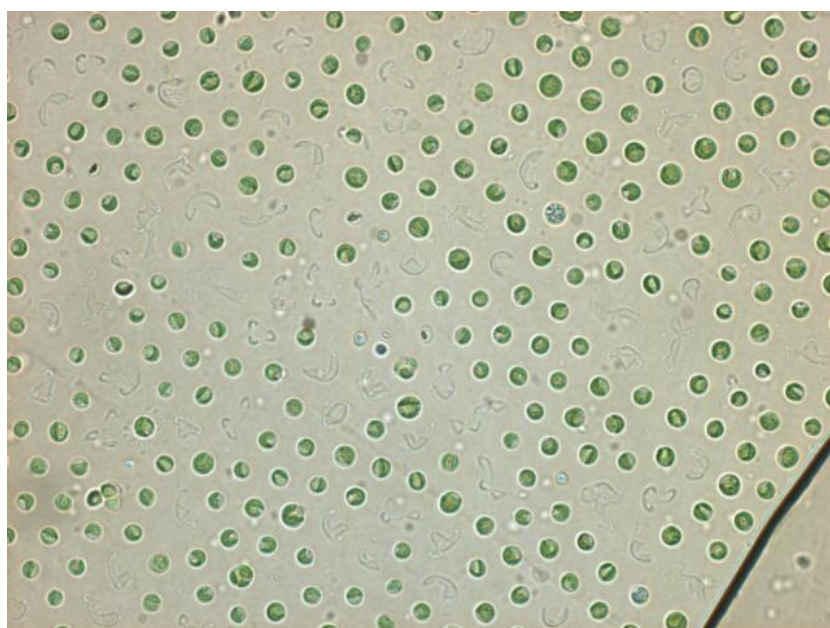


(a) *Cyanobacteria*, (b) *Chlorophyceae*, (c) *Rhodophyta* e (d) *Chrysophyta*.

Fonte: Coleção de cultura de algas da Universidade do Texas em Austin ([www.autex.org](http://www.autex.org)).

A clorofícea *Chlorella vulgaris* (Figura 4), particularmente, é rica em  $\omega$ -3 (ácido graxo de cadeia longa) e muito utilizada no tratamento de águas residuárias, por possuir elevada eficiência na remoção de nutrientes, bem como elevada concentração de lipídeos em sua biomassa. Além disso, apresenta rápido crescimento e facilidade de adaptação (XIE *et al.*, 2013). Todos esses fatores associados levaram à escolha desta espécie para utilização no presente trabalho.

Figura 4. Foto de um cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*.



Fonte: Próprio autor.

As microalgas oleaginosas são repletas de lipídeos, polares e neutros, como: fosfo e glicolipídeos e mono, di e triacilgerídeos, sendo que na Tabela 1 é apresentado o perfil de substratos oleaginosos das mesmas. Grânulos lipídicos neutros são o foco de terceira geração de biodiesel. Mono, di e triacilgeróis são proeminentes em *Phaeodactylum tricornutum* e *Chlorella vulgaris*. Estas espécies seriam, portanto, relevantes à otimização de qualidades de produto, especialmente no que diz respeito a densidade, poder calorífico, viscosidade cinemática e grau de saturação. Em contraste, *Chlamydomonas reinhardtii* é genuinamente predisposta à concentração de ácidos graxos livres, indesejáveis à transesterificação (GE *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2018; LOHMAN *et al.*, 2013; PIGNOLET *et al.*, 2013).



Tabela 1. Perfil de substratos oleaginosos de microalgas.

Espécie	Substrato (%)			
	Ácidos graxos livres	Monoglicerídeos	Diglicerídeos	Triacilgliceróis
<i>C. vulgaris</i>	1,90	0,05	2,30	21,55
<i>P. tricornutum</i>	1,40	0,65	2,10	27,40
<i>C. reinhardtii</i>	2,60	0,05	2,40	8,50

Fonte: Ge *et al.* (2017); Kumar *et al.* (2018); Lohman *et al.* (2013); Pignolet *et al.* (2013).

A Tabela 2 apresenta grupos de microalgas de acordo com o potencial de acúmulo de lipídeos, sendo assim classificadas de acordo com a produção: hiperacumuladoras, em torno de 57 %; superacumuladoras, em torno de 32 %; normais, em torno de 21,5 %; e hipoacumuladoras, em torno de 8,5%. A produção citoplasmática de acetil-COA, alongação e dessaturação são os principais processos de síntese de triglicérides. Nesta rota bioquímica, ACCase (carboxilase de acetil-COA) modula malonil-COA que é precursor de lipídeos neutros. Super e hiperacumuladores são, portanto, efetivos à promoção de reações por reguladores enzimáticos de metabolismo de lipídeos.

Tabela 2. Grupos de microalgas pelo potencial de acúmulo de lipídeos.

Grupo	Microalga	Lipídeos (%)	Produtividade de biodiesel* (l/ha)
Hiperacumulador	<i>N. oleoabundans</i>	65,70	128.553,00
	<i>S. obliquus</i>	57,10	111.725,65
	<i>Desmodesmus</i> sp.	55,00	107.616,65
	<i>Micractinium</i> sp.	50,00	97.833,35
	$x \pm \sigma, n = 4$	$56,95 \pm 6,55$	$111.432,15 \pm 12.815,30$
Superacumulador	<i>B. braunii</i>	33,55	65.646,15
	<i>C. closterium</i>	30,50	59.678,35
	$x \pm \sigma, n = 2$	$32,05 \pm 2,15$	$62.662,25 \pm 4.219,90$
Normal	<i>C. pyrenoidosa</i>	26,75	51.340,85
	<i>C. vulgaris</i>	26,50	51.851,65
	<i>C. sorokiniana</i>	22,00	43.046,65
	<i>Dunaliella salina</i>	20,00	39.133,30
	<i>C. reinhardtii</i>	20,00	39.133,30
	<i>Rhodomonas</i> sp.	20,00	39.133,30
	<i>Chaetoceros</i> sp.	20,00	39.133,30
	<i>Euglena gracilis</i>	20,00	39.133,30
	<i>C. protothecoides</i>	18,75	36.687,50
	$x \pm \sigma, n = 9$	$21,55 \pm 3,00$	$42.177,05 \pm 5.853,55$
Hipoacumulador	<i>Scenedesmus</i> sp.	12,00	23.480,00
	<i>Hindakia</i> sp.	10,00	19.556,65
	<i>S. platensis</i>	10,00	19.556,65
	<i>H. tetrachotoma</i>	7,50	14.675,00
	<i>Arthrospira máxima</i>	6,50	12.718,00
	<i>S. máxima</i>	5,00	9.783,35
$x \pm \sigma, n = 6$	$8,50 \pm 2,60$	$16.631,65 \pm 5.102,35$	

Fonte: Adaptado de Chisti (2007).

### 2.3 CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO

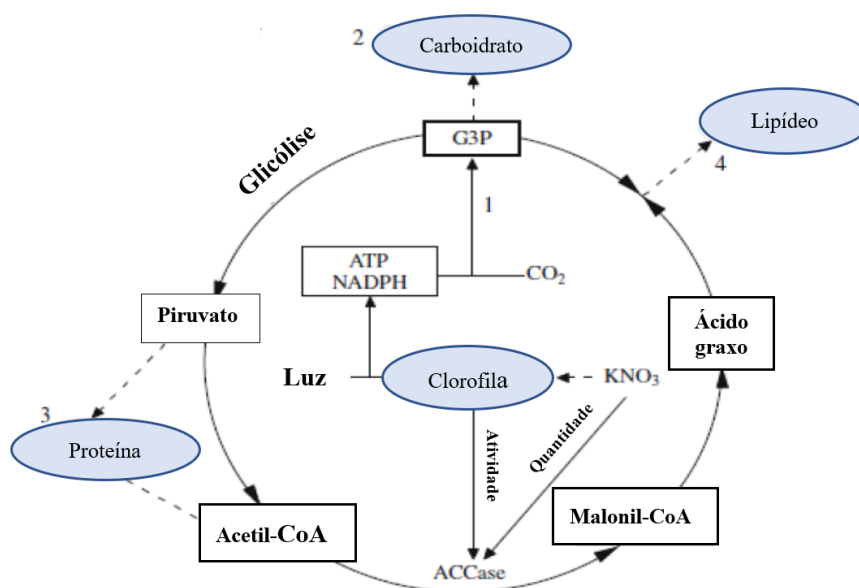
De acordo com Vasudevan; Briggs (2008), o mecanismo de conversão de energia solar em lipídeos pelo metabolismo celular dentro das microalgas ocorre por meio da fotossíntese, que se inicia com a captura de um fóton por um elétron em um anel conjugado de ligações duplas no interior de uma molécula pigmento, causando uma excitação. O nível de energia dessa excitação determina o comprimento de onda da luz que pode ser coletada pelos pigmentos nos organismos fotossintéticos por meio de proteínas complexas especializadas na colheita de luz. Há uma organela presente nos organismos fotossintetizantes conhecida como cloroplasto, que possui o pigmento

clorofila responsável pela sua cor verde. É no cloroplasto que ocorre a fotossíntese, pois este possui RNA, DNA e ribossomos, podendo, assim, sintetizar proteínas. Dentro dos cloroplastos há um sistema de membranas, denominado tilacóides, onde ocorrem as reações de luz da fotossíntese.

A fotossíntese ocorre em etapas complementares: foto e bioquímica. Em fotodependência, há conversão de energia luminosa ou física em ATP (adenosina trifosfato) e NADP (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida), substratos de reações de carboxilação, redução e regeneração de Ciclo de Calvin-Benson, por excitação eletrônica de fotólise de água. Em fotoindependência, a pentose, RuBP (1,5-ribulose-bisfosfato), associa-se ao CO<sub>2</sub> e produz 3-PGA (3 ácido fosfoglicérico), precursor de gliceraldeído-3-fosfato e, invariavelmente, glicerol. A compreensão de ciclo fotoperiódico é indispensável ao planejamento do cultivo e, circunstancialmente, à indução de síntese lipídica (CHAUDHARY *et al.*, 2014; GHIMIRE *et al.*, 2017; KANDILIAN *et al.*, 2014).

Na Figura 5 é mostrado um esquema do mecanismo de conversão de energia solar em energia química pelo metabolismo celular, ou seja, a síntese de biomoléculas que está relacionada a várias reações enzimáticas que dão origem à formação de carboidratos, proteínas, lipídeos, pigmentos e vitaminas.

Figura 5. Esquema do mecanismo da conversão da energia solar em energia química por fotossíntese.



Fonte: Adaptado de Ming Lv *et al.* (2010).

A energia de excitação necessária para as reações de fotossíntese passa para os fotossistemas PSI e PSII (centro de reação). No PSII esta energia é utilizada para a dissociação da água em prótons, elétrons e oxigênio e o gradiente de prótons aciona a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Prótons e elétrons são recombinados por meio da FRN (ferredoxina-NADP+ oxirredutase) produzindo NADPH. No ciclo de Calvin, com a utilização de ATP e NADPH, são produzidos açúcares, óleos, amidos e outras biomoléculas, acontecendo simultaneamente a fixação do CO<sub>2</sub>. De acordo com Fortman *et al.* (2008), a biossíntese de ácidos graxos parte do composto acetil-CoA produzido por várias rotas metabólicas. Em alguns microrganismos fotossintéticos, os prótons e elétrons extraídos da água são fornecidos a uma enzima (a hidrogenase), para a produção de hidrogênio.

Na Tabela 3 as microalgas são agrupadas pela velocidade de crescimento (g/l/dia), conforme o que segue: precoce, em torno de 3,85 g/l/dia; normal, em torno de 1,55 g/l/dia; e tardio, em torno de 0,15 g/l/dia. Espécies de *Micractinium* sp. são frequentemente termófilas e, naturalmente, habitam fontes geotérmicas e crescem rapidamente. O cultivo de termófilos é relevante à produção industrial de biodiesel, pois economiza energia durante tratamento térmico de contaminantes microbianos e no refrigeração de sistema (ONAY *et al.*, 2014; SMITH-BADORF *et al.*, 2013).

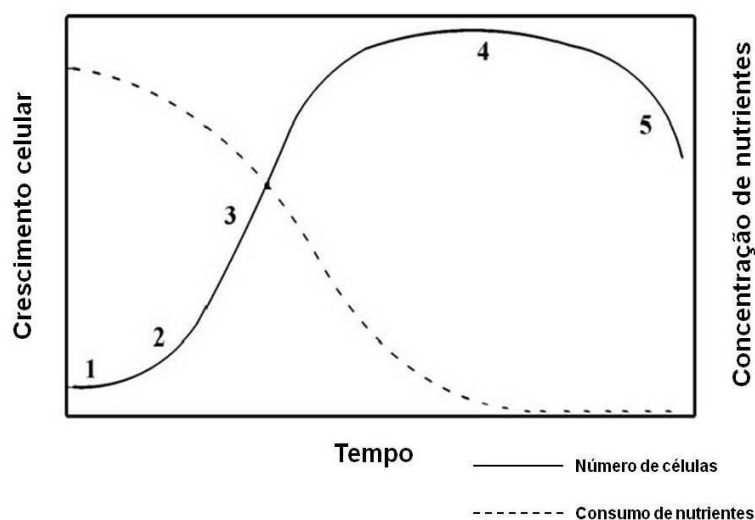
Tabela 3. Grupos de microalgas pela velocidade de crescimento.

Grupo	Microalga	Taxa de crescimento (g/l/dia)	Referência
Precoce	<i>Micractinium</i> sp.	4,25	Onay <i>et al.</i> (2014)
	<i>H. tetrachotoma</i>	3,75	
	<i>Scenedesmus</i> sp.	3,50	
	$\bar{x} \pm \sigma, n = 3$	$3,85 \pm 0,40$	
Normal	<i>C. vulgaris</i>	1,80	Abou-Shanab <i>et al.</i> (2011)
	<i>C. mexicana</i>	1,65	
	<i>S. obliquus</i>	1,25	
	$\bar{x} \pm \sigma, n = 3$	$1,55 \pm 0,30$	
Tardio	<i>C. minor</i>	0,20	Chatsungnoen; Chisti (2016)
	<i>Neochloris</i> sp.	0,20	
	<i>N. salina</i>	0,15	
	<i>C. fusiformis</i>	0,10	
	$\bar{x} \pm \sigma, n = 4$	$0,15 \pm 0,05$	

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 6 é possível observar uma curva típica das fases do crescimento das microalgas em cultivos do tipo batelada, que consiste em: (1) fase *lag* ou de adaptação; (2) fase de crescimento pré-exponencial; (3) fase *log* ou de crescimento exponencial; (4) fase estacionária; e (5) fase de declínio ou morte celular.

Figura 6. Curva típica de crescimento celular (linha contínua) e concentração de nutrientes (linha tracejada).



Fonte: Adaptado de Mata *et al.* (2010).

Para análise da concentração de biomassa e da taxa de crescimento específico, aplicam-se as expressões algébricas, Eq. (1) e Eq. (2), respectivamente, ponderáveis à precisa seleção de espécimes à produção de óleo (CHOI; JANG; KAN, 2018; DENG *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2017).

$$y = \frac{x_{max}}{1+e^{m-\mu T}} \quad (1)$$

$$\mu = \ln \left( \frac{x_j - x_i}{t_j - t_i} \right) \quad (2)$$

onde:

$y$ : concentração de biomassa (g/l);

$x_{max}$ : máxima concentração de biomassa ou capacidade de suporte de biosistema (g/l);

$m$ : constante de proporcionalidade;

$T$ : tempo de cultivo (dias);

$\mu$ : taxa de crescimento específico (g/l/dia);

$x_i$ : densidade inicial de células ( $\mu\text{g/l}$ );

$x_j$ : densidade final de células ( $\mu\text{g/l}$ );

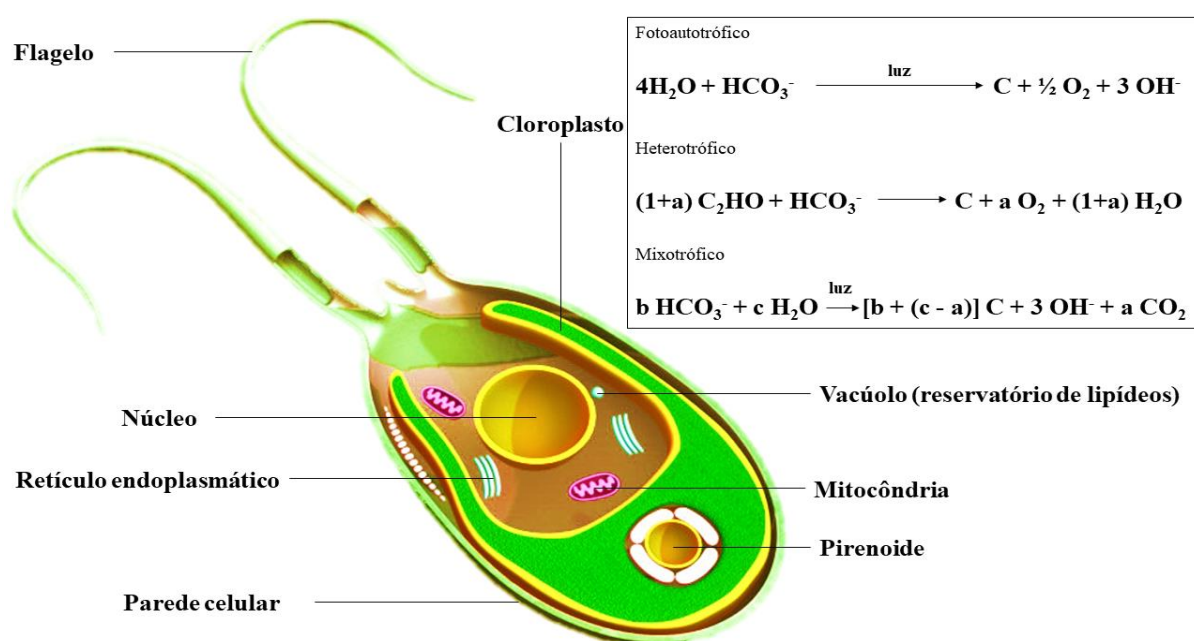
$t_i$ : tempo inicial (dias);

$t_j$ : tempo final (dias).

## 2.4 CULTIVO DE MICROALGAS

O comportamento fisiológico é determinado por hábito de crescimento apresentado na Figura 7 (CHAUDHARY *et al.*, 2014). Portanto, a versatilidade metabólica da microalga permite manipulação de concentração intracelular de lipídeos, controlando-se condições de cultivo, tais como: oferta nutricional, pH, taxa de injeção de  $\text{CO}_2$ , fotoperíodo e temperatura (GHIMIRE *et al.*, 2017; KANDILIAN *et al.*, 2014).

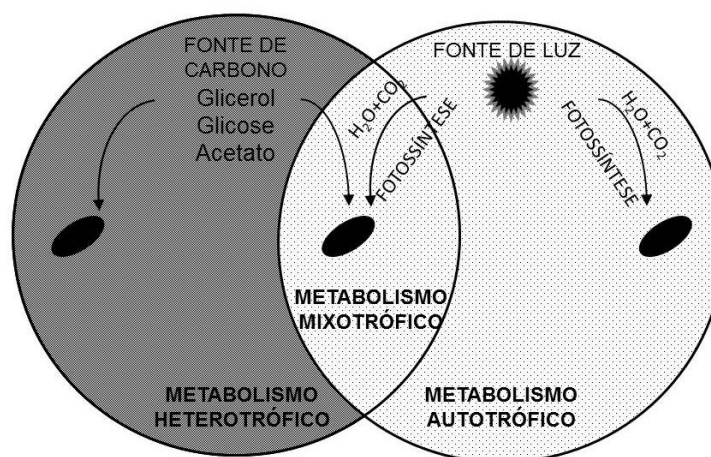
Figura 7. Estrutura celular e metabolismo de microalga pelo hábito de crescimento.



Fonte: Chaudhary *et al.* (2014) e Ghimire *et al.* (2017).

As microalgas crescem e se desenvolvem autotrófica, heterotrófica e/ou mixotroficamente (Figura 8) em lagoas superficiais *raceway* e fotobioreatores. A produtividade e a qualidade de biomassa são influenciadas por contaminantes microbianos, CO<sub>2</sub>, fotoperíodo, minerais, O<sub>2</sub>, pH, radiação solar, salinidade e temperatura. Dióxido de carbono é, consensualmente, o principal fator limitante. Evolutivamente, células se adaptaram fisiologicamente à hipoconcentração de CO<sub>2</sub> de ecossistemas aquáticos naturais assimilando-o efetivamente. No entanto, a capacidade de assimilação e tolerância ao CO<sub>2</sub> são fatores específicos (DENG *et al.*, 2018; GHIMIRE *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2015; NDIMBA *et al.*, 2013; SINGH; SINGH, 2014; WONG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017).

Figura 8. Diferenças entre os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos.



Fonte: Adaptado de Mariano *et al.* (2010).

#### 2.4.1 Modalidades de Cultivo

Meios de cultivo consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos fora do seu meio natural. Esses meios devem suprir todas as necessidades nutritivas do microrganismo para síntese do material celular e a produção de metabólitos de interesse industrial (ANDRADE, FILHO-COLOZZI, 2014).

No que se refere ao metabolismo, as microalgas são classificadas em grupos de acordo com a sua forma de obtenção de energia e fonte de carbono, conforme mostrado na Tabela 4. A principal desvantagem de autotrofia, em relação à

heterotrófico e mixotrofia, é, aparentemente, a inferioridade de rendimento de biomassa, decorrente de fotoinibição de fase *log* ou exponencial de crescimento e desenvolvimento.

Tabela 4. Características de modos de cultivo microalgal.

Modo *	Fonte		Risco de contaminação
	Carbono	Energia metabolizável	
Autotrófico	CO <sub>2</sub> e/ou HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Luz	Insignificante
Heterotrófico	Glicose	Glicose	Significante
Mixotrófico	CO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e/ou glicose	Luz e CO <sub>2</sub> e/ou glicose	Significante

Fonte: Wang; Yang; Wang (2014) e Xia; Murphy (2016).

#### 2.4.1.1 Cultivo Autotrófico

O cultivo autotrófico, basicamente, multiplica células pelo fornecimento de luz e carbono inorgânico. Elogiável capacidade de sequestro de CO<sub>2</sub> e satisfatório reaproveitamento de gás de combustão, tornam esse cultivo, ambiental e economicamente, atrativo à terceira geração de biodiesel. Sendo que escalabilidade e insignificante risco de contaminação microbiana neste cultivo, devido à inexistência de substrato orgânico, o capacitam, também, ao planejamento de lagoas recirculativas e fotobioreatores.

O cultivo autotrófico dispensa, todavia, a glicose (fonte de carbono orgânico valorizadíssima na indústria alimentícia) e proporciona equilíbrio ao perfil de ésteres metílicos de *Chlorella* sp., concentrando-o, perceptivelmente, em ácidos (láurico, mirístico, esteárico e palmítico), fundamentais à qualidade do produto (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; ELUMALAI; PRAKASAM; SELVARAJAN, 2011).

#### 2.4.1.2 Cultivo Heterotrófico

A heterotrofia é uma alternativa à autotrofia e particulariza-se pela inexistência de luz e administração de carbono à nutrição celular. Indiferente à fotoinibição é, tecnicamente, viável a biorreatores e fermentadores. O cultivo heterotrófico apresenta como vantagens a fácil operacionalidade, o substancial rendimento de material graxo, a oportunidade de reciclagem de efluentes, e a economia de custo total de produção, sendo irrestrito quanto à aplicação de glicose e antieconômico à algacultura. Alguns pré-requisitos de microalgas ao cultivo heterotrófico são: facultade de divisão celular



sob ausência de iluminação, inespecificidade à glicose, adaptabilidade a oscilações microclimáticas, resistência a microrganismos antagônicos e resiliência a perturbações hidrodinâmicas (CHEIRSILP; TORPEE, 2012; RAWAT *et al.*, 2013).

Os sistemas heterotróficos podem se valer dos avanços obtidos da indústria de fermentação, que já produz biocombustíveis em escala comercial, como o bioetanol de cana-de-açúcar ou milho. Entretanto, a dependência por açúcares de outras fontes pode ser um ponto fraco desse sistema, pois pode gerar problemas como competição por terras férteis, água limpa e produção de alimentos, os mesmos observados na produção dos biocombustíveis de primeira geração (LI *et al.*, 2007).

#### 2.4.1.3 Cultivo Mixotrófico

Simultaneidade de eventos fotossintéticos e respiratórios é característica da mixotrofia, que, sugestivamente, integra luz, CO<sub>2</sub> e carbono orgânico à nutrição celular. Em lagoas recirculativas, especificamente, supre-se demanda de carbono orgânico, introduzindo-se glicose e/ou acetato, diurnamente, prevenindo-se, assim, eventual proliferação sob restrição luminosa (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011; UNTERLANDER; CHAMPAGNE; PLAXTON, 2017).

A pesquisa científica de melhoria de crescimento algáceo por intensidade e qualidade de iluminação artificial e concentração de glicose reporta superioridade técnica da mixotrofia, em relação à hetero e autotrofia, quanto ao rendimento de lipídeos: 210, 90 e 85 mg/l, respectivamente (CHEIRSILP; TORPEE, 2012). Hipoteticamente, a mixotropia é ideal à produção industrial de biodiesel, mas é sensível à contaminação microbiana e predisposta ao bioacúmulo de ácidos livres, que, sob concentrações críticas, inviabilizam a comercialização do produto (BRENNAN; OWENDE, 2010; GHIMIRE *et al.*, 2017).

## 2.5 SISTEMAS DE CULTIVO

Diversos meios de produção podem ser empregados no cultivo de microalgas, variando o volume de poucos litros até bilhões de litros, assim como sistemas pouco sofisticados, como no caso de cultivo em tanques abertos simples sob condições naturais de iluminação e temperatura, com baixo ou nenhum controle de parâmetros, ou sistemas mais sofisticados, como é o caso de fotobioreatores, onde se pode ter controle de vários parâmetros que afetam o cultivo (BOROWITZKA, 1999).

A ideia de cultivo de microalgas surgiu em 1952. Em 1960, japoneses a experimentaram, pioneiramente, em lagoa superficial ampla, sistematizada com dutos rudimentares que permitiam introdução compartimentada de inóculo e transferência de massa. Em 1970, Japão, Europa e Israel inauguraram, finalmente, plantas industriais para a produção de alimentos funcionais. Problemas técnicos associados à tradicionalidade motivaram, então, a engenharia de fotobioreatores. A tecnologia em questão é superiormente eficiente em relação à produtividade e qualidade de biomassa; todavia, onerosos custos de investimento, instalação e manutenção a inviabilizam economicamente à produção comercial de biodiesel, por isso há necessidade de otimizá-la (ADESANYA *et al.*, 2014; GUPTA; LEE; CHOI, 2015; KIM *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2015; RAWAT *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2013).

### 2.5.1 Lagoas Recirculativas

Lagoas superficiais recirculativas são os principais sistemas de produção industrial de microalgas. Fluxos contínuo, semi-contínuo e descontínuo as distinguem operacional, dimensional e produtivamente. Na Figura 9 é mostrada a forma de lagoas tipo pista em cultivo de tanque aberto (*raceway ponds*). Facilidade de colheita, devido à relação geométrica de área de exposição à radiação e volume de trabalho, a economia de custos de instalação e manutenção, além de restrito potencial de emissão de gases, compensam a irregularidade de rendimento técnico e a questionável qualidade do óleo. Por outro lado, intensiva evaporação diária de água, insustentabilidade de exploração de bioprodutos, invariável exigência de espécies resilientes, sazonalidades climáticas e contaminação se apresentam como algumas desvantagens (GUPTA; LEE; CHOI, 2015; RODOLFI *et al.*, 2009;).

A produtividade de *C. variabilis* em lagoa superficial semi-contínua equivale-se a 5,80 g/m<sup>2</sup>/dia (BHOWMICK *et al.*, 2014). Os autores enfatizam a importância de tratamento do meio com hipoclorito e/ou tiosulfato de sódio, antes da inoculação, bem como a manutenção de agitação mecânica a 15 rpm, para difusão de CO<sub>2</sub>, recirculação e homogeneização. Sharma *et al.* (2016) reportam a produção de 19,60 g/m<sup>2</sup>/dia *C. vulgaris* num experimento piloto. A variação de produtividade é absolutamente natural, pois há indetermináveis interações de espécies e projetos de lagoas, sendo que a extensão e profundidade das mesmas são características que influenciam na difusão de gases, na transferência de massa e, também, na profusão

da luz (GUPTA; LEE; CHO, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; MATHIMANI *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2016).

Figura 9. Lagoas fotossintéticas do tipo *raceway ponds*.

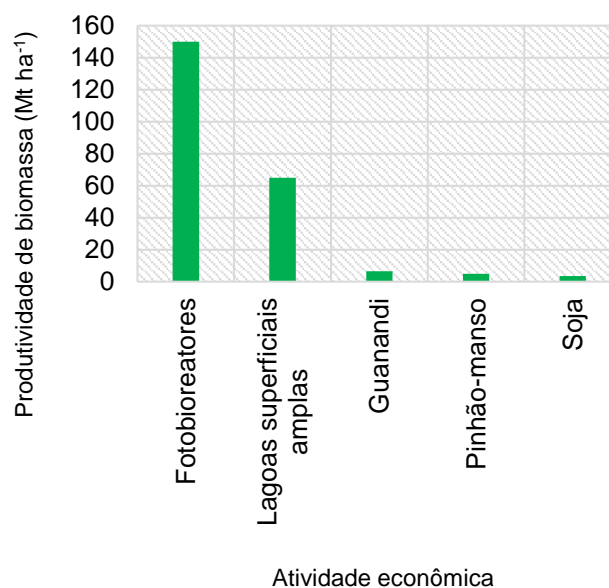


Fonte: Antunes; Silva (2010).

### 2.5.2 Fotobiorreatores

Embora antieconômicos em relação à investimento, operação e manutenção, os fotobiorreatores (Figura 10), são conceituados pelo emprego de luz à multiplicação celular, permitindo um rigoroso controle ambiental e incomparável produtividade de biomassa. Além disso, eles restringem a proliferação e a residência prolongada de microrganismos depreciativos à qualidade de óleo, e, também, possibilitam exploração industrial de químicos finos e bioprodutos de valor agregado; e, por isso, são adequados à biorrefinaria de microalgas (COLLET *et al.*, 2011; DIANURSANTI; SISTIAFI; PUTRI, 2018; GUPTA; LEE; CHOI, 2015; RAWAT *et al.*, 2013; UNTERLANDER; CHAMPAGNE; PLAXTON, 2017; YEN *et al.*, 2013).

Figura 10. Produtividade relativa de biomassa de microalga cultivada em fotobioreatores em comparação com outros processos.



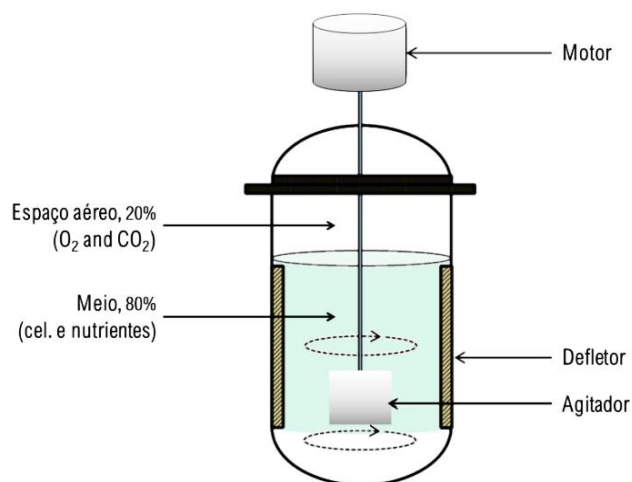
Fonte: Adesanya *et al.* (2014); Khudhair; Farid (2004); Rashid *et al.* (2014).

Existem vários fotobiorreatores que podem ser utilizados no cultivo de microalgas, dentre eles serão destacados a seguir os seguintes: tanque agitador, tubular vertical, coluna de bolhas, elevação de ar, tubular horizontal e de painel plano.

### 2.5.2.1 Tanque Agitador

A Figura 11 mostra um tanque agitador, constituído por motor, rotor, defletor e alimentador. Esta categoria é efetiva à transferência de massa, homogeneização de meio e profusão da luz, mas dificulta a colheita, devido à insignificante relação de área e volume, demanda substancial quantidade de energia ao acionamento de componentes hidrodinâmicos, e onera custos variáveis de operação e manutenção. Dispositivos de oxigenação e modernização de impulsores seriam, portanto, necessidades tecnológicas (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Figura 11. Esquemática de um tanque agitador.



Fonte: Gupta; Lee; Choi (2015).

### 2.5.2.2 Tubular Vertical

Constituídos por tubos transparentes (Figura 12), que permitem a penetração de luz, e por um sistema de recirculação, os fotobioreatores tubulares verticais são opções ao cultivo *outdoor*. As principais subcategorias são: coluna de bolhas e elevação de ar.

Figura 12: Fotobioreator do tipo tubular vertical.



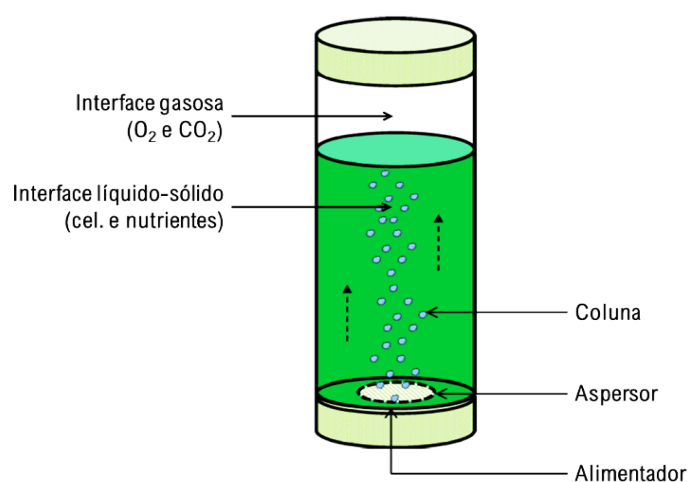
Fonte: Gouveia (2011).

#### 2.5.2.2.1 Coluna de Bolhas

Alternativa ao tanque agitador, a coluna de bolhas é, tecnicamente, versátil à produção de microalgas e leveduras fermentativas e ao tratamento de efluente.

Compressor e lâminas crivadas, que rompem e distribuem bolhas de ar coalescentes, são os principais elementos de projeto (Figura 13). Operacionalmente, bolhas de ar e meio ascendem à câmara de gases simultaneamente, enquanto, a massa líquida densa descende adjacente. Baixo custo de investimento, facilidade de colheita e economia de componentes hidrodinâmicos, são vantagens desta tecnologia. Por outro lado, heterogeneidade de distribuição de  $O_2$  e  $CO_2$  e irregularidade de produção de biomassa, são sérios inconvenientes (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Figura 13. Esquemática de fotobioreator tubular vertical de coluna de bolhas.

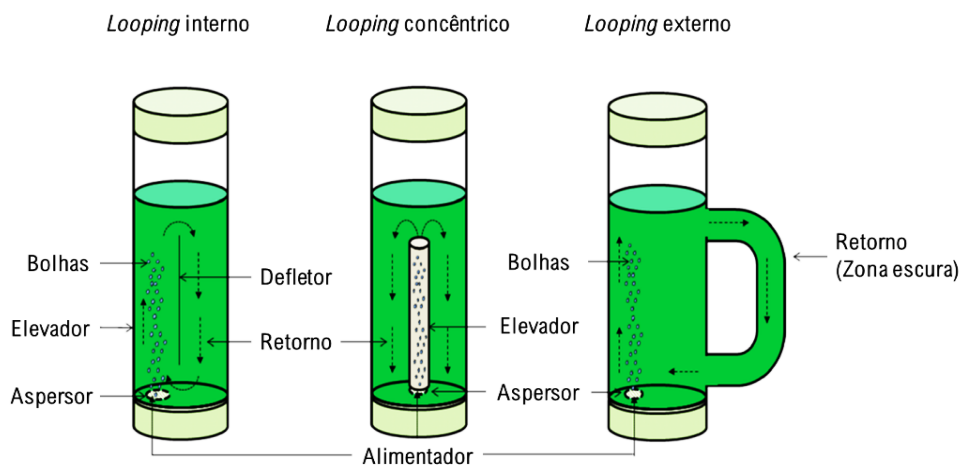


Fonte: Gupta; Lee; Choi (2015).

#### 2.5.2.2.2 Elevação de Ar (*Airlift*)

O hidrodinamismo de elevação de ar ocorre por separação física de fases: o sistema de alimentação introduz gases ao meio de cultivo; bolhas coalescentes emergem ao compartimento de retenção de interface gás-líquido; e, finalmente, há fluxo descendente de líquido denso, isento de bolhas, à medida que estas se desprendem de superfície. *Looping* interno, concêntrico e externo são padrões de recirculação (Figura 14) que simulam intermitência de iluminação às células, condicionando-as à fotossíntese e respiração (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Figura 14. Esquemática de fotobioreator tubular vertical de elevação de ar.

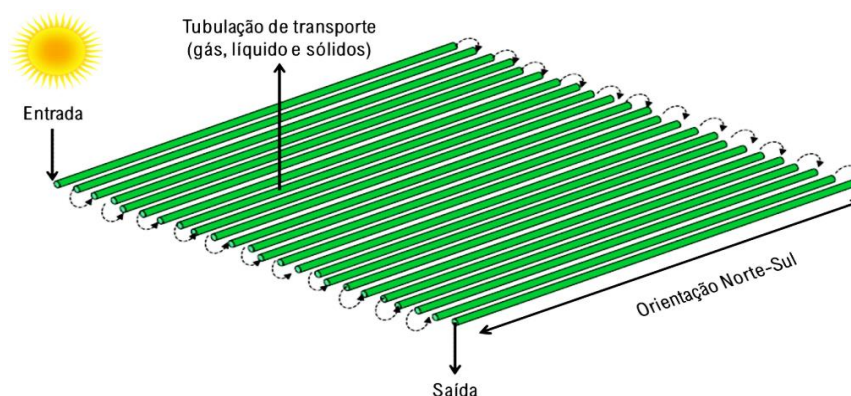


Fonte: Gupta; Lee; Choi (2015).

### 2.5.2.3 Tubular Horizontal

Popular à algacultura, o fotobioreator tubular horizontal caracteriza-se por: significativa relação de área e volume, ótimos padrões de difusão e distribuição de  $\text{CO}_2$  e de transferência de massa e homogeneização de meio. Inclinado e helicoidal são configurações alternativas ao controle natural de superaquecimento (Figura 15). Para escolha de *design*, orienta-se ponderar: ambiente de produção, custos de aquisição, operação e manutenção e, principalmente, finalidade de cultivo. Acúmulo de  $\text{O}_2$  sob níveis tóxicos à multiplicação celular, impraticabilidade em escala industrial, constante necessidade de arrefecimento artificial e limitado rendimento de biomassa e lipídeos neutros, são fatores dissuasivos à essa tecnologia (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

Figura 15. Esquemática de fotobioreator tubular horizontal.

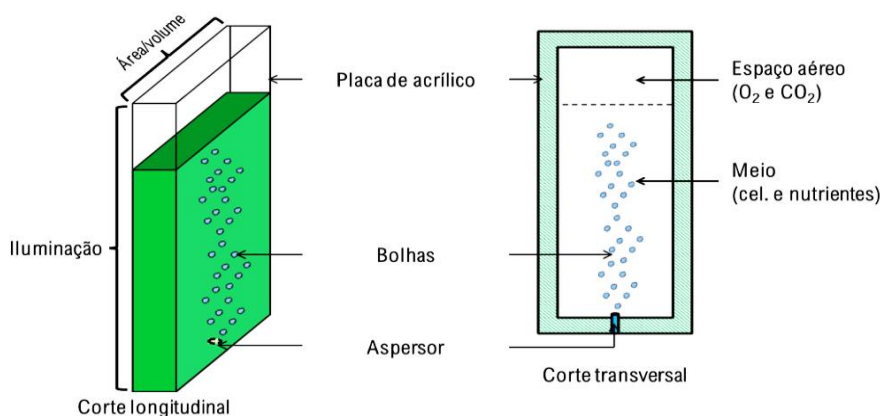


Fonte: Gupta; Lee; Choi (2015).

### 2.5.2.4 Painel Plano

O painel plano é geometricamente simples, possui considerável relação de área e volume e não possui dispositivos hidrodinâmicos e sistema de aeração por injeção de ar (Figura 16). Em relação aos fotobioreatores tubulares, garante ótima eficiência fotossintética e restringe superacúmulo de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, apresenta insustentabilidade em larga escala, devido às limitações em rendimentos de biomassa e lipídeos, por superficialidade de penetração de luz, complexidade de controle de temperatura e ineficiência de homogeneização de interfaces (PRUVOST *et al.*, 2011; SLEGGERS *et al.*, 2011).

Figura 16. Esquematização de fotobioreator de painel plano.



Fonte: Gupta; Lee; Choi (2015).

## 2.6 UTILIZAÇÃO DE EFLUENTE COMO MEIO ALTERNATIVO

Um dos problemas graves para a humanidade será a escassez de recursos de água potável no futuro. O desenvolvimento da piscicultura de água doce é um fator agravante para este problema, pois existe um alto índice de produtos químicos tóxicos, como amônia (NH<sub>3</sub>) e nitrito (NO<sub>2</sub>). Estudos apontam o potencial de algas verdes, em especial a espécie *Chlorella vulgaris*, para remover o excesso desses contaminantes, devido à sua alta capacidade de absorção de nutrientes, bem como a alta produção de biomassa. Isso abre perspectivas animadoras para sua aplicação em processos de purificação em água de piscicultura (HEIDARI; FARHADIAN; MAHBOOBI, 2011; HESNI *et al.*, 2020; RAMOS, PIZARRO, 2018).

A possibilidade de utilizar meios de cultivos alternativos surgiu devido aos custos elevados com reagentes químicos necessários para o crescimento das



microalgas, tido como um dos maiores problemas do cultivo, por representarem de 40 a 60% de seu custo total (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Dentre os meios de cultura alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se o esgoto doméstico esterilizado, os efluentes de biodigestores, o lodo digerido, os despejos industriais purificados, a vinhaça de cana-de-açúcar, as águas residuárias da produção de azeite de oliva e os resíduos da suinocultura, dentre outros (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

Efluentes são nutricionalmente autossuficientes para promover o crescimento e desenvolvimento de microalgas (CALIXTO *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2018; KOTHARI *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2015; LAL; DAS, 2016). A produção industrial de 1 kg de biomassa algácea demanda 3,725 kg de água-doce e expressivo aporte de fertilizantes sintéticos (especialmente N e P), que podem ser contaminantes e poluentes. O reaproveitamento de efluente agrícola, agroindustrial ou urbano, a fim de substituí-los e garantir sustentabilidade à ficologia, seria, portanto, oportuno (DENG *et al.*, 2018; SALAMA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2011).

Descartar os efluentes negligentemente, ao invés de reutilizá-los ou recicla-los, implica em impactos a ecossistemas naturais (eutrofização de corpos hídricos, poluição atmosférica, salinização de ambientes de produção agropecuária, etc...). Ricos em elementos minerais e orgânicos, estes efluentes possibilitariam cultivo microalgal sustentável, que os reaproveitariam, transformando-os, então, em matéria-prima tecnicamente aplicável à transesterificação de biodiesel e biorrefino de alimentos funcionais e químicos. A avaliação do ciclo de vida de uma planta industrial de microalga comprova que a substituição de água-doce por efluente reduz, sensivelmente, o custo total de produção de biomassa (CALIXTO *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2018; KOTHARI *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2015; LAL; DAS, 2016).

Águas residuárias municipais e de bovinocultura leiteira, suinocultura, aquicultura, indústria de celulose e papel, processamento de óleo de palma, assim como de usina sucroenergética, são alternativas exequíveis à algacultura. A biodiversidade de microalgas é magnífica. Há, entretanto, espécies sensíveis a efluentes com elevada demanda bioquímica de oxigênio e carga mineral (CALIXTO *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2018; GENTILI, 2014; HENA *et al.*, 2015; JEBALI *et al.*, 2015; MANDAL; MALLICK; 2009; RAMIREZ *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2017).

Os autores enfatizam que a turbidez é determinante à produtividade e qualidade de material graxo; por isso sugerem a diluição, para que haja suficiente penetração de luz em meio. Pesquisas científicas (Tabela 5) corroboram o sinergismo de diluição em perfil de ácidos graxos de *C. vulgaris* (CHOI; JANG; KAN, 2018; MANDOTRA *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017).

Tabela 5. Percentual de ácidos graxos em biomassa de *C. vulgaris* por fator de diluição de água residuária.

Ácido graxo (%)	Efluente		Meio-padrão BG-11
	Diluição x 1	Diluição x 10	
Palmítico	4,95	11,00	6,40
Esteárico	52,60	52,95	56,70
Oleico	16,50	19,80	9,30
Linoleico	-	11,35	4,40
γ-Linoleico	-	3,20	-
Araquídico	18,55	29,85	16,15
Docosanóico	7,05	6,50	6,60

Fonte: Choi; Jang; Kan (2018).

Embora as águas residuárias de aquicultura sejam menos usuais, a pesquisa científica de Heidari; Farhadan; Mahboobi (2011) sobre produção de biomassa e fitorremediação de  $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2^-$  de efluente de piscicultura por microalgas (*S. quadricauda*, *C. vulgaris* e *Tetradismus obliquus*) demonstrou e discutiu os benefícios nutritivos de coproduto à qualidade de matéria-prima, sugerindo-o, inclusive, para substituição de água-doce e fertilizantes minerais. Informações de aplicação de resíduo de ranicultura à ficologia são escassas, de modo que se propõe investigá-la nesta tese.

## 2.7 FATORES QUE INFLUENCIAM O CULTIVO

Microalgas sintetizam lipídeos naturalmente, mas há possibilidades de indução e intensificação de síntese, estressando-as por controle nutricional, intensidade e qualidade de iluminação, fotoperíodo, pH e injeção de  $\text{CO}_2$  (CHO *et al.*, 2013; SUTHAR; VERMA, 2018).

### 2.7.1 Nutrição

A síntese atípica de lipídeos é produto de restrição, principalmente, nutricional. Subdosagem de N altera dinâmica de carbono e, conseqüentemente, induz o organismo à metabolização de triacilgliceróis, ao invés de proteínas e carboidratos. Portanto, a estratégia de controle de nutrição é estimular mecanismos adaptativos latentes, sem sequer prejudicá-los (IDRIS *et al.*, 2017). Inúmeras são as enzimas que regulam superprodução de lipídeos em microalgas sob limitação nutritiva, destacando-se: sintase II de  $\beta$ -cetoacil-ACP, dessaturase de  $\Delta 9$ -estearoil-ACP e tiosterase de oleoil-ACP (PRUVOST *et al.*, 2011).

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que requerem carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K). Os micronutrientes que geralmente são importantes para o desenvolvimento das microalgas são: ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e cobalto (Co). Além disso, algumas espécies também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (CARVALHO *et al.*, 2012; NAYAK *et al.*, 2016).

### 2.7.2 Iluminação Artificial

Intensidade e qualidade de luz afetam eficiência fotossintética e, invariavelmente, o crescimento específico e a síntese de lipídeos. Para maximização da produtividade, deve-se iluminar o fotobioreator uniformemente. O estresse luminoso modifica o teor e a composição de óleo em *C. pyrenoidosa*, *Scenedesmus* sp., *Amphora subtropical* e *Dunaliella* sp., sendo que, sob intensificação, há decréscimo da disponibilidade de lipídeos neutros. Por isso, é importante a fonte de fótons (BENMOUSSA-DAHMEN *et al.*, 2016; FAN *et al.*, 2014; PANCHA; CHOKSHI; MISHRA, 2015; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2016; YEN *et al.*, 2013).

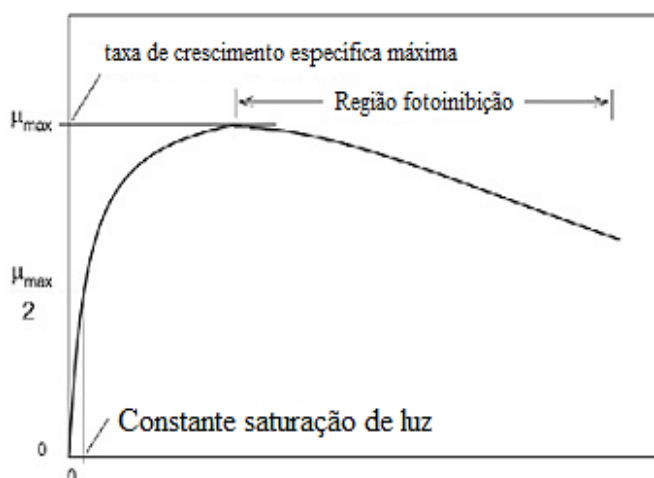
A alternância de horas de luz e escuro determina saldos de ATP e NADP, em fase fotoquímica. Os substratos energéticos em questão são precursores de síntese de glicose, produto bioquímico. Equilibrá-la significaria, portanto, induzir e inibir rotas de lipídeos, proteínas e carboidratos. O ciclo fotoperiódico ideal à indução de síntese de lipídeos é 18:6 h, sendo que um excesso de luminosidade a inibiria completamente (SUTHAR; VERMA, 2018).

Segundo Fishman *et al.* (2010), para alcançar elevada produtividade de biomassa por área iluminada, ambos os sistemas de cultivo fotoautotrófico de microalgas, seja aberto ou fechado, necessitam garantir exposição adequada de cada célula à luz, de maneira a reduzir os efeitos causados pela fotossaturação ou fotoinibição no desenvolvimento do cultivo. Assim, nos cultivos com densidade elevada podem haver uma camada superficial iluminada, na qual as células realizam a fotossíntese, e uma camada escura junto ao fundo do cultivo, na qual a intensidade de luz encontra-se abaixo do ponto de compensação e a fotossíntese líquida é negativa (RICHMOND, 2004). Altas intensidades de luz podem causar fotossaturação e baixas intensidades podem reduzir a eficiência fotossintetizante. Nestes dois casos, pode ocorrer uma redução na produtividade de biomassa.

Portanto, a iluminação, segundo Lourenço (2006), é um dos pilares do cultivo de microalgas que requerem atenção especial. Os melhores resultados com cultivos de microalgas são alcançados com iluminação artificial fluorescente. A lâmpada deve ser instalada na prateleira onde está o frasco com a cultura, a fim de fornecer mais energia do que apenas a luz difusa do ambiente. É a intensidade luminosa que irá desencadear os processos para que a fotossíntese se complete. A quantidade de luz recebida pelas células está relacionada ao carbono que será fixado pela microalga e influenciará na taxa de crescimento das culturas de microalgas (DERNER *et al.*, 2006).

A fotoinibição consiste na saturação luminosa a intensidades relativamente baixas. Assim, a fotoinibição crônica resulta no dano do aparato fotossintético, diminuindo a eficiência quântica e a taxa fotossintética máxima, a qual está associada ao dano e a substituição da proteína D1 do centro de reação do PSII, sendo necessária à sua remoção e substituição por uma molécula recém-sintetizada (TAIZ; ZEIGER, 2006). Isto ocorre pelo fato de as algas serem capazes de absorver uma quantidade muito maior de fóton do que podem coletar e transferir para o PSI (AMOS, 2004). Na Figura 17 é mostrada graficamente a essência deste fenômeno.

Figura 17. Dependência entre a eficiência fotossintética e a intensidade da radiação luminosa.



Fonte: Adaptado de Chisti (2007).

### 2.7.3 Temperatura

A temperatura influencia o crescimento específico, a concentração e composição de biomassa e, também, o perfil de ácidos graxos. Em *N. salina* e *Ochromonas danica*, especialmente, há intensificação de teor lipídico, à medida que se eleva a temperatura. Em contraste, *C. sorokiniana* é insensível ao estresse térmico (CHOKSHI *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2018).

Sob a perspectiva de Suthar; Verma (2018), que multiplicaram *C. vulgaris* autotroficamente, expondo-as a pH, fotoperíodo e concentrações de nitrato e fosfato de 8, 18:6 h, 50 mg/l e 17,5 mg/l, respectivamente, em temperaturas superiores a 30 °C, foi verificada a indução ao super acúmulo de lipídeos. Kumar *et al.* (2018) confirmam esse fato, mas com exposição a 2.000 lux e um fotoperíodo de 12:12 h.

### 2.7.4 pH

O pH do meio é um dos fatores de grande importância que envolve o cultivo de microalgas, pois o mesmo é responsável por determinar a solubilidade do dióxido de carbono e os minerais presentes (BECKER *et al.*, 1988). Um exemplo disto é a amônia, que, presente na solução em temperatura de 25 °C e pH 7, apresenta 99,3% de  $\text{NH}_4\text{-N}$  e 0,7% de  $\text{NH}_3$  e, ao atingir um pH de 9, estes valores passam a ser 64,2% de  $\text{NH}_4\text{-N}$  e 35,8% de  $\text{NH}_3$  (TRUSSEL, 1972, VON SPERLING *et al.*, 2005).

Assim, se faz necessário avaliar mais detalhadamente o papel do pH no crescimento das microalgas utilizadas no tratamento de efluentes, pois o pH é dependente de vários fatores como a composição e capacidade de tamponamento do meio, a quantidade de dióxido de carbono, o metabolismo dos microorganismos e a temperatura (BECKER *et al.*, 1988).

Quinlan (1984) obteve uma correlação para um pH “ótimo” com o processo de nitrificação, ou seja, como o valor do pH pode afetar na oxidação da amônia no tratamento de águas residuárias, tendo sido possível observar a diminuição do valor do pH com o aumento da concentração de amônia.

### 2.7.5 Nitrogênio

A amônia está presente em solução na forma de íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e na forma livre, não ionizada ( $\text{NH}_3$ ). Ainda que ocorra o processo de volatilização da amônia livre para a atmosfera, alguns autores acreditam que esta é insignificante se comparada com outros mecanismos de remoção do nitrogênio, tais como a nitrificação-desnitrificação e a sedimentação (VON SPERLING *et al.*, 2005).

O nitrogênio assimilado pelas microalgas na forma de nitrato e amônia é destinado para a síntese de compostos celulares, produção de proteínas e outros compostos que contém nitrogênio. No entanto, a assimilação destes dependerá de outros fatores, tais como temperatura, carga orgânica, tempo de retenção hidráulica e radiação solar (MONTEGGIA; TESSELE, 2001).

Becker (1994) mostrou os efeitos dos diferentes regimes de nitrogênio nos parâmetros de crescimento e componentes nas microalgas, para duas clorófitas (*Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*) e para quatro cianobactérias (*Spirulina platensis*, *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa* e *Oscillatoria rubescens*). Para todas as algas estudadas o aumento dos níveis de nitrogênio conduziu a um aumento da biomassa, do conteúdo de proteínas e de clorofila. Em baixos níveis de nitrogênio, as clorófitas apresentaram níveis de lipídeos totais em torno de 45%.

De-Bashan *et al.* (2011) encontraram altas taxas de eliminação de amônia após estudarem diferentes espécies de *Chlorella* sob diferentes concentrações de efluente, como: NaCl; CaCl; MgSO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>. Assim, eles puderam concluir o grande potencial das microalgas no tratamento de águas residuais

contendo amônia e fósforo como principais nutrientes, além disso observaram o crescimento de bactérias promotoras de crescimento de microalgas.

### **2.7.6 Agitação**

O processo de agitação de uma suspensão microalgal torna-se igualmente importante, pois permite que as células fiquem suspensas no meio, melhora a eficiência da utilização da luz, favorece a troca de gases, impede a estratificação térmica, auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes, evita acúmulo de matéria orgânica no fundo do biorreator e a sedimentação das microalgas, e, ainda, reduz a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND, 2004).

A agitação do meio exerce grande influência sobre a distribuição da luminosidade em cultivos microalgais (SERENOTTI *et al.*, 2004). Jourdan (2001) afirma que altas intensidades luminosas com alta agitação propiciam crescimento ótimo, pois todos os filamentos recebem cargas frequentes de luz, mas, ao mesmo tempo, são constantemente sombreadas por outros filamentos, promovendo proteção contra exposição excessiva à luz.

Com a agitação do meio de forma correta é possível distribuir equitativamente a energia luminosa com o aumento da frequência do ciclo claro-escuro, além de aumentar a taxa de difusão entre as células, facilitando as trocas gasosas e o acesso aos nutrientes dissolvidos no meio (RICHMOND, 2004). Portanto, é importante o desenvolvimento de um sistema de cultivo que possibilite um ciclo de permanência de cada uma das células na camada iluminada e na camada escura (ciclo luz/escuro), de forma a minimizar os efeitos da exposição a períodos longos em cada uma das camadas do cultivo (RICHMOND, 2004).

Outro parâmetro para o qual a eficiência da agitação do meio pode ser preponderante é a taxa de oxigênio dissolvido nos cultivos de microalgas. Em cultivos cuja velocidade de agitação não é adequada, elevadas concentrações de oxigênio dissolvido podem provocar a inibição da fotossíntese. Uma maior turbulência no fluxo dos cultivos gera uma maior volatilização do oxigênio produzido pelas algas durante a fotossíntese, reduzindo sua concentração no meio de cultivo, o que permite atingir concentrações maiores de biomassa (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2009).

Em cultivos de microalgas realizados em escala laboratorial, a agitação pode ser realizada com o auxílio de um *shaker* ou através de aeração, que é feita com injeção de ar, através de mangueira de silicone no fundo do frasco ou através de bombas de aquário externas. Para que a dissolução dos gases seja mais eficiente, é necessário produzir bolhas pequenas. Esse efeito pode ser obtido pelo uso de pedras porosas ou pipetas de vidro de ponta fina na extremidade das mangueiras (LOURENÇO, 2006). Nos cultivos em grande escala pode-se utilizar compressores de ar, bombas mecânicas ou borbulhamento de ar (LOURENÇO, 2006; BRENNAN; OWENDE, 2010).

## 2.8 COLHEITA DE MICROALGAS

A colheita de matéria algácea em suspensão é uma etapa crítica. Tamanho de célula (50  $\mu\text{m}$ ), insignificantes concentração de biomassa (0,5 a 5 g/l), densidade e gravidade específica, e carga superficial eletronegativa (-40 mV), são as principais características de microalgas que as tornam complexas. Grupos funcionais próton-ativos, carboxílicos, hidroxilas, aminas, fosfóricos, são responsáveis pela dispersão de células em meio, principalmente na fase exponencial de crescimento (GHERNAOUT; GHERNAOUT, 2012; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; UMMALYMA *et al.*, 2017).

As técnicas convencionais de colheita são: centrifugação, filtração, biofloculação, flotação, imobilização, sedimentação e coagulação. Na Tabela 6 são destacadas as principais técnicas (mais utilizadas), sendo que, para a escolha de uma delas, deve ser considerada a finalidade de cultivo. Centrifugação e flotação, particularmente, são ideais à produção industrial de biocombustíveis, enquanto, eletroforese, é aplicável à industrialização de bioprodutos, pois é relativamente, onerosa, devido ao expressivo consumo energético, insatisfatória capacidade operacional e necessidade de equipamentos e reagentes específicos. Custo acessível, ínfimo potencial de impacto ambiental, aplicabilidade e escalabilidade seriam, portanto, características desejáveis (CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017; LAL; DAS, 2016; SHARMA *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2015; UMMALYMA *et al.*, 2017; VANDAMME *et al.*, 2011; VONSHAK; RICHMOND, 1988; ZHANG *et al.*, 2010).



Tabela 6. Principais características dos métodos de colheita de biomassa microalgal.

Método	Características relevantes	Vantagem	Desvantagem
<b>Filtração</b>	Pode funcionar sob pressão ou vácuo.	Fator de concentração elevado.	Limitado a microalgas coloniais ou filamentosas. Possível colmatção. Processo moroso.
<b>Centrifugação</b>	A recuperação depende das características de sedimentação das células, do tempo de permanência na centrífuga, da temperatura e da profundidade de decantação.	Para a maioria das microalgas é eficaz. A biomassa fica bastante concentrada.	Processo moroso e não é energeticamente eficiente, o que se reflete no aumento dos custos.
<b>Floculação</b>	A adição de agentes químicos induz a agregação das células das microalgas por neutralização, inversão das cargas eléctricas das paredes celulares ou por formação de ligações entre as microalgas.	A floculação proporciona o aumento do tamanho das partículas, o que torna a sedimentação mais rápida.	O processo pode ser moroso e carece de muito espaço. A utilização de floculantes pode tornar o processo dispendioso à escala industrial. Possível alteração do produto final.
<b>Sedimentação</b>	Quantidade de biomassa	Processo simples e de custos reduzidos. Ausência de agentes químicos.	Processo lento e produto final com elevado teor de água. Em ambientes de temperatura elevada a biomassa pode ficar deteriorada.

Fonte: Próprio autor.

### 2.8.1 Colheita por Centrifugação

A maioria de plantas industriais de produção de biodiesel 3G emprega centrifugação para colheita de biomassa. Embora, aparentemente onerosa, a técnica é viável, desde que haja complementariedade de químicos finos e bioprodutos comercializáveis à indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos e têxteis, para compensar significativo consumo de energia, custos operacionais e intermediária qualidade de biocombustível (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016; HEO *et al.*, 2017; LAL; DAS, 2016).

Força centrífuga, temperatura e tempo de retenção de 5.800 g, 4,5 °C e 10 minutos, respectivamente, garantem eficiência à recuperação de biomassa *C. vulgaris*, *P. tricornutum* e *C. reinhardtii* cultivadas em fotobioreator (LOHMAN *et al.*,

2013). Os autores pontuam a secagem como fator antieconômico e a extração de lipídeos de material úmido como possível solução. Condições operacionais do centrifugador são funções de resistência mecânica de célula, engenharia de equipamento e finalidade de cultivo.

A Tabela 7 mostra as condições operacionais de colheita de biomassa algácea por centrifugação.

Tabela 7. Condições operacionais de colheita de biomassa algácea por centrifugação.

Microalga	Rotação (rpm) ou força centrífuga (g)	Temp. (°C)	Retenção (min)	Referência
<i>C. vulgaris</i>	8.000 rpm	-	10,0	Al-Lwayzy; Yusaf; Al-Juboori (2014)
<i>Chlorella</i> sp. <i>Nannochloropsis</i> sp.	1.585 g	-	15,0	Cheirsilp; Torpee (2012)
<i>C. vulgaris</i>	9.055 g	-	10,0	Tran <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella</i> sp.	5.000 rpm	-	15,0	Zhu <i>et al.</i> (2017)
<i>C. vulgaris</i> <i>B. braunii</i>	16.000 rpm	25,0	-	Sydney <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella</i> sp. <i>Chlorococcum</i> sp.	4.000 rpm	-	10,0	Pan <i>et al.</i> (2017)
<i>C. vulgaris</i>	17.000 g	-	10,0	Unterlander; Champagne; Plaxton (2017)
<i>Neochloris</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp.	5.000 rpm	-	5,0	Gumbi <i>et al.</i> (2017)
<i>C. vulgaris</i> <i>N. oculata</i>	4.600rpm	4,0	15,0	Dianursanti; Sistiafi; Putri (2018)
<i>C. vulgaris</i>	4.500 rpm	4,0	15,0	Choi; Jang; Kan (2018)
<i>C. vulgaris</i>	5.800 g	4,0	10,0	Lohman <i>et al.</i> (2013)
<i>P. tricornutum</i> <i>C. reinhardtii</i>	20.000 g	-	15,0	Hu <i>et al.</i> (2014)

Fonte: Próprio autor.

Há espécies permissíveis à filtração, mas disposição de material orgânico extracelular em membrana ocasiona obstrução de malha, tornando-a intransigente à limpeza ou, até mesmo, inutilizável. Complementarmente, é possível colher células suspensas por imobilização, retendo-as ou aprisionando-as em hidrogel de alginato

(biocompatível à solução tamponante de carbonato de sódio) (BABEL; TAKIZAWA, 2010; CHEIRSILP, THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017).

### 2.8.2. Colheita por Biofloculação

Flutuabilidade, mobilidade e natureza eletroquímica são componentes de estabilidade celular. O princípio de biofloculação é, portanto, promover agregação e sedimentação de biomassa por neutralização, ou a redução parcial de cargas negativas, introduzindo-se ao meio de cultivo, cátions polivalentes e/ou polímeros de origem orgânica. Sulfatos e cloretos de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  são exemplos de sais inorgânicos floclulantes exequíveis para *C. vulgaris*, *C. fusiformis*, *C. minor* e *Neochloris* sp. (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2013; LAL; DAS, 2016; PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010; SHARMA *et al.*, 2016).

Apesar de atrativa à biorrefinaria, devido ao baixo custo e boa eficiência, a floclulação química inviabiliza células, altera pigmentação e afeta condições do meio, tornando-o, circunstancialmente, inabitável. Adsorção de inorgânicos e possibilidade de insatisfatórios processos de extração solvente, recuperação e purificação de lipídeos neutros, caracterizariam desvantagens adicionais (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016; GRANADOS *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2012; PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010; PROCHAZKOVA; KASTANEK; BRANYIK, 2015).

A biofloculação, analogamente à floclulação, caracteriza-se pela agregação de sólidos suspensos por polímeros extracelulares, como: polissacarídeos e proteínas de animais, vegetais e microrganismos. Diversidade e acessibilidade de bioprodutos, seletividade, aplicabilidade e biodegradabilidade são fatores que a promovem à colheita alternativa de biomassa algácea (ALAM *et al.*, 2016; UMMALYMA *et al.*, 2017).

## 2.9 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

O rendimento de extração é fundamental à sustentabilidade de produção de biodiesel de microalga e, comprovadamente, capaz de garanti-lo em escala industrial. A utilização de solventes orgânicos para realização da extração de lipídeo realizada no presente trabalho, tem como os principais métodos: Bligh e Dyer, Folch, Folch-Bligh e Dyer. Para a extração lipídica também podem ser utilizados os solventes

superiores, eutéticos, líquidos iônicos, fluidos supercríticos e destilação a vácuo (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

### **2.9.1 Solventes Orgânicos**

Baixo custo de aquisição, operacionalidade e precisão são argumentos para aplicação de solventes orgânicos. Em relação à prensagem (método mecânico), proporcionam excelente extração de lipídeos neutros, devido à polaridade. Especificidade e possibilidade de contaminação são, entretanto, problemáticos à sustentabilidade de tecnologia (LAM; LEE, 2012).

Fosfolipídeos, ácidos graxos livres, esteróis, acilgliceróis e ésteres permitem transesterificação e esterificação metanólica e etanólica. Todavia, somente, triacilgliceróis são úteis à industrialização de biodiesel 3G, pois proporcionam qualidade energética ao produto. Solventes orgânicos de amplo espectro extraem, simultaneamente, lipídeos polares, apolares e pigmentos, e, portanto, prejudicam a pureza do bicomustível. Por isso, é importante selecioná-los criteriosamente (ATADASHI; AROUA; AZIS, 2010; MORADI-KHEIBARI; AHMADZADEH; HOSSEIN, 2017; SATHISH; SIMS, 2012).

Os solventes polares n-hexano, benzeno, tolueno, éter e clorofórmio, integrados com acetona, acetato etílico, etanol e metanol, desvinculam lipídeos apolares e neutros, sendo que essa ruptura de interação é a função de lipofilicidade (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

#### *2.9.1.1 Sistema Bligh-Dyer*

Esse sistema utiliza concentrações de clorofórmio e metanol, sendo que essa composição é absolutamente capaz de extrair lipídeos neutros e estruturais, desassociando-os de proteínas de membrana. A polaridade e o componente alcoólico possibilitam satisfatória taxa de recuperação de ácidos graxos, em relação ao n-hexano, cuja principal vantagem é o restrito potencial de toxicidade. O risco de contaminação por clorofórmio, biocomposto de espécies vegetais aquáticas, é, inclusive, uma crítica social à produção de biodiesel (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016; ELLISON; OVERA; BOLDOR, 2019).

### 2.9.1.2 Sistema Folch

O sistema Folch é análogo ao de Bligh-Dyer, caracterizando-se apenas pela maior proporção de clorofórmio, em relação ao metanol. Rapidez e facilidade de processamento simultâneo de múltiplas amostras são as principais vantagens desse sistema, enquanto, imprecisão e restrição à extração em larga escala, devido à real possibilidade de contaminação ambiental, implicam em limitações (KUMAR *et al.*, 2015).

### 2.9.1.3 Sistema Folch-Bligh-Dyer

O sistema híbrido Folch-Bligh-Dyer é a alternativa às desvantagens de convencionalidade, pois essa tecnologia extrai todas as classes de lipídeos, precisamente, e soluciona eventuais problemas de contaminação por clorofórmio, substituindo-o por solventes orgânicos superiores e eutéticos. Prepará-la pela mistura de metil-terc-butil éster, metanol e água, assegura significativa extração de lipídeos neutros (KUMAR *et al.*, 2015).

## 2.9.2 Solventes Superiores

Sugestivamente, solventes superiores (2-etoxietanol, metanol, isopropanol, butanol, ésteres de ácido acético e n-hexano) oferecem múltiplos benefícios técnico-econômicos à extração, pois são ótimos extratores e potenciais substitutos de clorofórmio, biocomposto que compromete saúde humana por patologias orais agudas e irritações dermatológicas (HUANG *et al.*, 2014; JONES *et al.*, 2012; MORADI-KHEIBARI; AHMADZADEH; HOSSEINI, 2017; SHENG; VANNELA; RITTMANN, 2011).

Moradi-Kheibari; Ahmadzadeh; Hosseini (2017) mostram que solventes superiores são, circunstancialmente, ineficientes à extração de lipídeo em relação às metodologias que utilizam clorofórmio, como as de Folch e Bligh-Dyer, conforme mostra a Tabela 8.

Os índices de polaridade de n-hexano e clorofórmio são relativamente, representativos: 0,10 e 4,10, respectivamente. Por isso, sistemas que os contemplam são excelentes extratores de lipídeos neutros. Espécie de microalga, teor de água de biomassa, tempo de retenção, afinidade solvente, solubilidade e classe de lipídeo são

fatores adicionais que influenciam rendimento e qualidade de extração (KUMAR *et al.*, 2015).

Tabela 8. Eficiência de extração de lipídeos por solventes

Solvente	Eficiência (%)
Clorofórmio:metanol, 1:2 v/v	38,55
n-hexano:metanol, 1:2 v/v	25,30
Clorofórmio:metanol, 2:1 v/v	25,15
Clorofórmio:metanol, 1:1 v/v	21,50
Éter de petróleo:metanol, 1:1 v/v	8,50
Éter de petróleo:metanol, 1:2 v/v	0,75
Éter de petróleo:metanol, 2:1 v/v	6,15
n-hexano:metanol, 1:1 v/v	18,75
n-hexano:metanol, 2:1 v/v	21,25
n-hexano:etanol, 1:1 v/v	11,85
n-hexano:etanol, 1:2 v/v	15,10
n-hexano:etanol, 2:1 v/v	12,50

Fonte: Moradi-Kheibari; Ahmadzadeh; Hosseini (2017).

### 2.9.3 Solventes Eutéticos

Solventes eutéticos são, usualmente, compostos por sais orgânicos e doadores de ligações de hidrogênio. Amônia quaternária, cloridrato de colina, aminas, álcoois e os ácidos, carboxílico, acético e oxálico, destacam-se pela higroscopicidade, durante a síntese de biodiesel por transesterificação *in situ* de biomassa integral úmida (DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2013; PAN *et al.*, 2017). A integração de cloridrato de colina a ácidos orgânicos, principalmente, propanoico, rende 8,90 a 10,55 % de ésteres metílicos (PAN *et al.*, 2017).

### 2.9.4 Líquidos Iônicos e Fluidos Supercríticos

Os líquidos iônicos (cloridrato de 1-butil-3-metilimidazólio, sulfato metílico de 1-etil-3-metilimidazólio, sulfonato trifluorometano de 1-butil-3-metilimidazólio, acetato de 1-etil-3-metilimidazólio, dietilfosfato de 1-etil-3-metilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio e cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio) e os fluidos supercríticos (etanol, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, produtos de temperaturas e pressões extremas), são alternativas

técnico-econômicas à solventes orgânicos. Economia de consumo energético, flexibilidade, estabilidade e inocuidade, são aspectos positivos que justificam a utilização dos mesmos na extração industrial de lipídeos (KIM *et al.*, 2013; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2016).

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA DE MICROALGA

Desenvolveu-se a pesquisa, no Laboratório de Biomassa e Bioenergia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/Unesp Dracena). A espécie de microalga foi *Chlorella vulgaris*, oriunda do Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. Para a obtenção de cultura pura, multiplicaram-se células em meio Illman (Tabela 9), selecionado após testes preliminares realizados no laboratório (Apêndice A).

Tabela 9. Propriedades nutricionais de meio Illman.

Nutriente *	Concentração(g/l)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2030
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	1,3610
KCL	2,2360
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4650
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0100

Fonte: Illman; Scragg; Shales (2000).

A Figura 18 mostra o experimento realizado para multiplicação das células em meio Illman. Foram utilizados um total de 24 frascos de 3 l, previamente esterilizados em autoclave em cada etapa experimental.

Figura 18. Multiplicação das células em meio Illman.

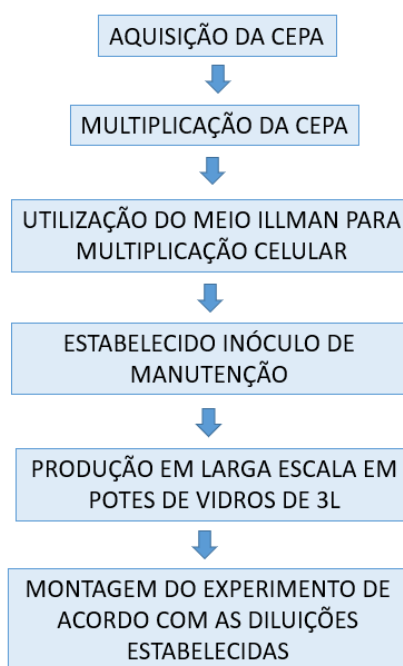


Fonte: Próprio autor.



A Figura 19 mostra um fluxograma desde a aquisição da cepa e estabilização do cultivo para produção de inóculo por meio de multiplicação celular até a montagem do experimento com as diluições estabelecidas.

Figura 19. Fluxograma da etapa de preparo da cepa e do inóculo.



Fonte: Próprio autor.

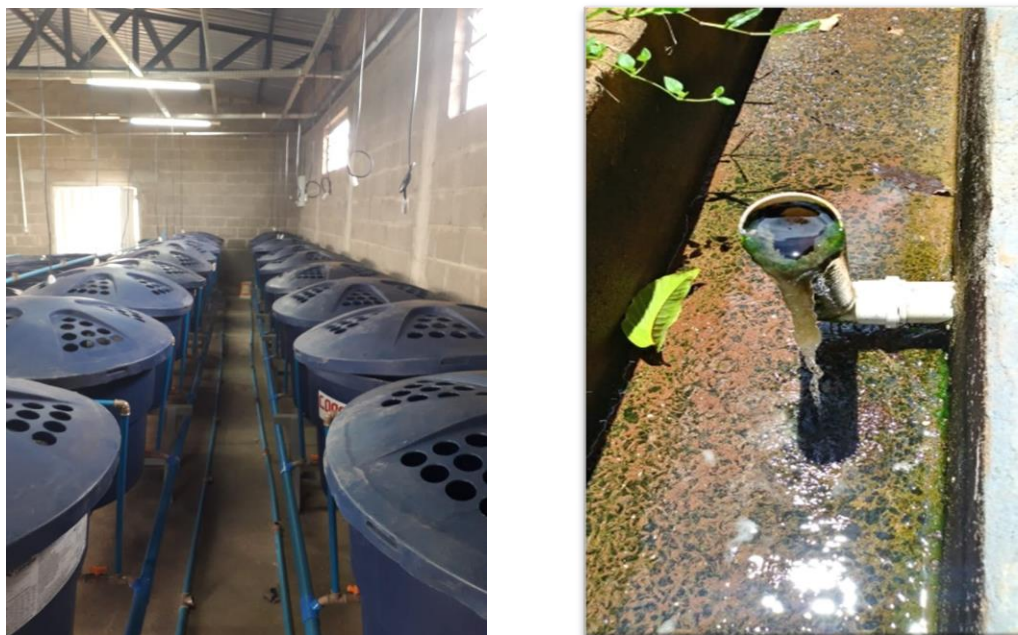
### 3.2 COLETA DE EFLUENTES

Coletaram-se águas residuárias de sistemas de piscicultura e ranicultura de laboratórios de aquicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) da UNESP – Câmpus de Dracena e da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, respectivamente. Amostraram-se os efluentes, estocando-os, posteriormente, em galões de 20 l, para aferição do pH, amônia, nitrato e nitrito. A escolha da utilização de efluentes de aquicultura se deu por conta da disponibilidade e do menor número de pesquisas encontrados na literatura consultada, visto que os efluentes mais utilizados são os provenientes da vinhaça e da suinocultura.

O estudo foi realizado com água de piscicultura coletada em dois locais, o primeiro com uma menor densidade de peixe (5 tilápias de 800 g), em reservatório contendo 1.000 l de água), e o segundo com uma elevada densidade de peixe (50

tilápias de 800 g), em reservatório contendo 1.000 l de água, visto que para o cálculo de densidade foi utilizado a massa de cada peixe pelo volume de água do reservatório ( $\text{kg/m}^3$ ). A água de rã utilizada foi coletada em uma baía de 200 l contendo 75 rãs. A Figura 20 mostra fotos dos locais de coleta de efluentes.

Figura 20. Local de coleta de efluentes no sistema de piscicultura e ranicultura.



Fonte: Próprio autor.

### 3.3 CULTIVO E COLHEITA

Para a implementação do cultivo foi utilizada água de aquicultura e delinearam-se os meios Illman, APBD (águas residuárias de piscicultura de baixa densidade), APAD (águas residuárias de piscicultura de alta densidade e AR (águas residuárias de ranicultura), nas concentrações 5, 20, 35 e 50 %; no esquema fatorial 4 x 4, ou seja, água de aquicultura e concentrações em triplicata, conforme descrito na Tabela 10, para reduzir erros sistemáticos e garantir reprodutibilidade ao estudo.

A escolha das diluições foi baseada em experimentos prévios (vide Apêndice A), que levaram em consideração a turbidez do meio em comparação a diferentes meios sintéticos e, também, as características dos efluentes utilizados, para a formulação de meio de cultivo.

Tabela 10. Descrição dos tratamentos com os meios de cultivo.

<b>Especificação do meio (percentual em volume)</b>	<b>Quantidade de Inóculo (ml)</b>	<b>Água de aquicultura (ml)</b>
5% Meio Ilman	950	50
20% Meio Ilman	800	200
35% Meio Ilman	650	350
50% Meio Ilman	500	500
5% Meio APBD	950	50
20% Meio APBD	800	200
35% Meio APBD	650	350
50% Meio APBD	500	500
5% Meio APAD	950	50
20% Meio APAD	800	200
35% Meio APAD	650	350
50% Meio APAD	500	500
5% Meio AR	950	50
20% Meio AR	800	200
35% Meio AR	650	350
50% Meio AR	500	500

Fonte: Próprio autor.

Os potes de vidro de 3 l, com sistema de aeração, foram dispostos em prateleiras de uma estante de metal, com circuito de iluminação artificial fluorescente para simulação de fotossíntese (Figura 21), no qual foram introduzidos inóculos sob densidade fitoplanctônica de  $298 \times 10^3$  células/m<sup>3</sup>, previamente determinada por meio de contagem celular.

As contagens de células foram realizadas em microscópio com o auxílio de uma lâmina de microscópio com marcação em quadrante e de dimensões conhecidas, denominada câmara de Neubauer (Figura 22). Foram feitas no aumento de 400 vezes nos quadrantes central (em duplicata) e, para assegurar a confiabilidade do método, o resultado foi multiplicado pelo fator de correção da câmara de Neubauer (10.000).

Figura 21. Estante de metal, com circuito de iluminação artificial fluorescente.

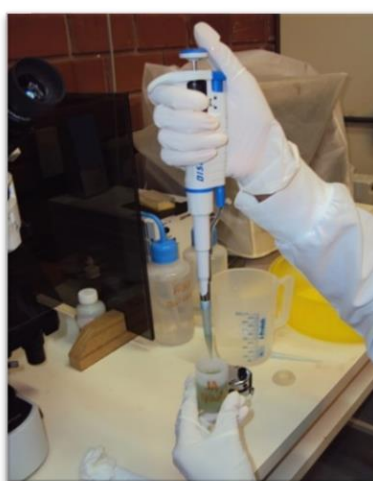


Fonte: Próprio autor.

Figura 22. Contagem celular.



(a) Microscópio.



(b) Pipetagem da amostra.

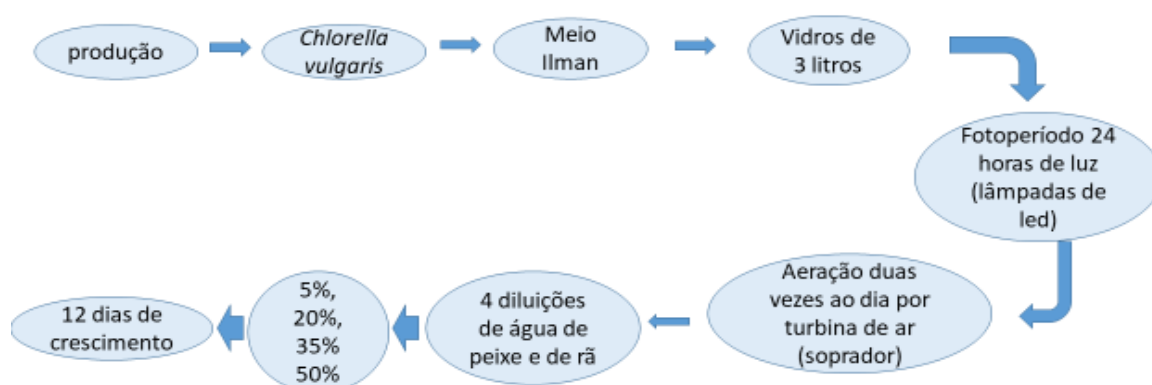


(c) Câmara de Neubauer.

Fonte: Próprio autor.

Operacionalmente, cultivou-se *C. vulgaris* à temperatura, ciclo fotoperiódico e intensidade de luz de  $25 \pm 5$  °C, 24:0 h e 5.000 luxes, respectivamente, por 12 dias, aerando-se o sistema por compressor de ar (soprador), para homogeneização de meio. As demais condições de cultivo estão destacadas na Figura 23.

Figura 23. Fluxograma das condições de cultivo de microalga em água de aquicultura.



Fonte: Próprio autor.

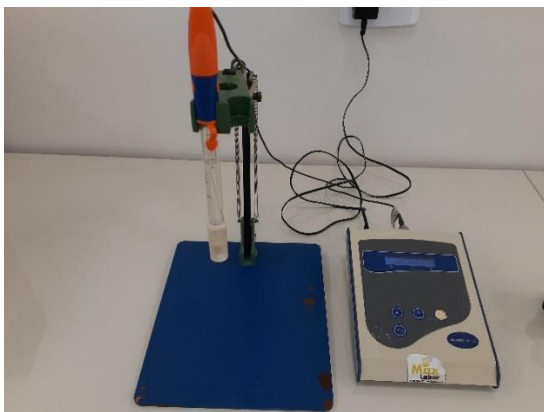
Durante o cultivo foram determinados os valores de pH, as concentrações de amônia, turbidez, clorofila e de biomassa seca. Também, ao final do cultivo foram avaliadas as concentrações de proteína, de lipídeos totais, carboidratos e cinzas. Durante a avaliação cultivo foi observado uma diminuição do meio devido a perda de água por evaporação.

### 3.4 ANÁLISE QUANTITATIVA

#### 3.4.1 Monitoramento do pH

O monitoramento do pH foi realizado por meio de um pHmetro, com Eletrodo Seletivo de íons (ISE), da marca Max Labor, previamente calibrado com solução tampão (Figura 24).

Figura 24. Foto do pHmetro utilizado nos experimentos.



Fonte: Próprio autor.

### 3.4.2 Monitoramento do Nitrogênio Amoniacal

Monitorou-se o nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) por meio de um espectrofotômetro Hanna, com a utilização de kits do próprio equipamento (vide Figura 25).

Figura 25. Foto do espectrofotômetro utilizado nos experimentos.



Fonte: Próprio autor.

### 3.4.3 Determinação de Turbidez

Determinou-se a transparência de meio por absorbância, em um espectrofotômetro UV-vis da marca Nova Instrumentos (vide Figura 26), através do *software* Lambda UV/VIS Spectrometer com cubetas de caminho óptico de 1 cm e comprimento de onda de 540 nm. A água destilada foi utilizada como “branco” para zerar a leitura do equipamento (TAHER, 2013).

Através da análise de absorvância pode-se determinar a turbidez dos cultivos, indicando maior ou menor presença de células e biomassa de microalgas.

Figura 26. Foto do espectrofotômetro UV-vis utilizado nos experimentos.



Fonte: Próprio autor.

#### 3.4.4 Monitoramento da Concentração de Clorofila

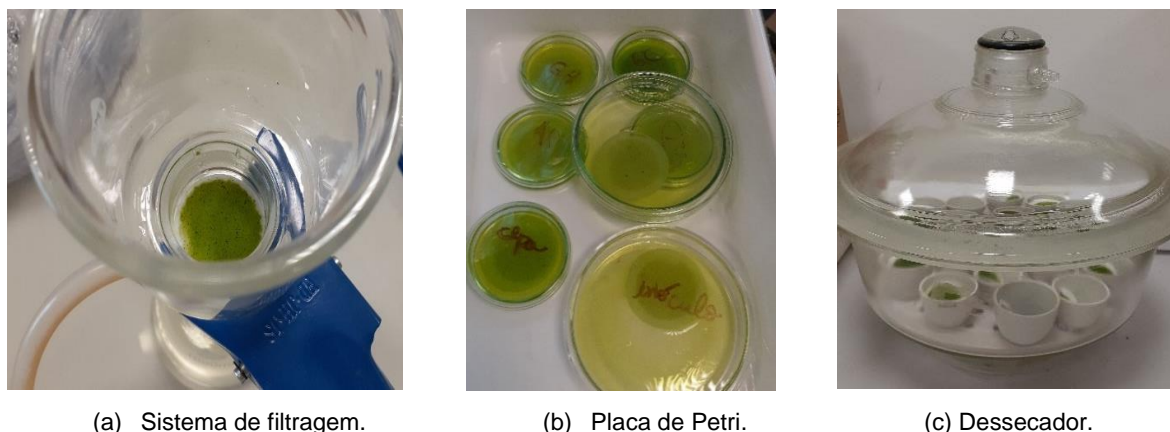
O método utilizado para determinação de clorofila foi o proposto por Wood (1985) para extração do pigmento. Para tanto, filtraram-se 10 ml de amostra em membrana de microfibras de vidro, com abertura de poro de 1  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente, a membrana que reteve as células de microalgas foi colocada em repouso num dessecador para reduzir sua umidade. Depois de reduzida a umidade, a membrana foi imersa em 10 ml de solução de clorofórmio-metanol, na proporção de 2:1 v/v.

As placas de Petri, mantendo-se o conjunto (solução e membrana filtrante), foram colocadas em ambiente escuro, por 4 horas, para processar a extração da Clorofila-A. Após este intervalo de tempo, foi medida a absorvância do extrato nos comprimentos de onda de 750 nm e de 665 nm, utilizando-se um espectrofotômetro no UV-vis da NOVA INSTRUMENTOS (Figura 27).

A Figura 27 mostra parte do processo para determinação do teor de clorofila.

Figura 27. Parte do processo para determinação do teor de clorofila.



(a) Sistema de filtragem.

(b) Placa de Petri.

(c) Dessecador.

Fonte: Próprio autor.

E, finalmente, calculou-se a concentração de clorofila pela Eq. (3):

$$C_a = \frac{P(A_{665} - A_{750})FV}{SPL} \quad (3)$$

onde:

$C_a$ : clorofila ( $\mu\text{g/l}$ );

$P$ : constante de proporcionalidade (13,2 mg.cm/l);

$A_{665}$ : absorvância a 665 nm;

$A_{750}$ : absorvância a 750 nm;

$F$ : fator de correção de teor de água (1.000  $\mu\text{g/mg}$ );

$V$ : volume de solução extratora (ml);

$S$ : volume de amostra (ml);

$PL$ : caminho ótico de cubeta (1 cm).

### 3.4.5 Determinação de Biomassa Seca

A determinação de biomassa seca (g/l) foi realizada através de metodologia gravimétrica (TREVISAN, 2013). Foram utilizados microfiltros de fibra de vidro, diâmetro de 47 mm para filtragem utilizando bomba a vácuo. Primeiramente, os microfiltros foram levados à estufa com temperatura de 60 °C até atingirem massa constante para a retirada de sua umidade natural e depois a massa dos microfiltros secos foi determinada.



Depois disso, três amostras de 10 ml dos cultivos foram retiradas e filtradas separadamente. Os microfiltros com as amostras foram levados à estufa a temperatura de 60 °C até atingirem massa constante. O aparato de filtração, é constituído por bomba, filtro, membrana e filtrado, como pode ser observado na Figura 28. As massas foram determinadas em uma balança analítica de precisão.

Figura 28. Filtração das amostras.



Fonte: Próprio autor.

Por fim, o cálculo da biomassa seca foi feito através da Eq. (4).

$$B_s = \frac{m_f - m_a}{V} \quad (4)$$

onde:

$B_s$ : biomassa seca (g/l);

$m_f$ : massa de filtro seco (g);

$m_a$ : massa de filtro com amostra (g);

$V$ : volume (l).

### 3.5. RECUPERAÇÃO E SECAGEM DA BIOMASSA

A colheita da biomassa é um fator importante que vem sendo bastante pesquisado devido à dificuldade de separação da microalga do meio, por conta do reduzido tamanho da maioria das espécies (GRANADOS *et al.*, 2012, ABDELAZIZ *et al.*, 2014). Assim, dentre todos os métodos existentes mencionado na revisão da

literatura, optou-se pela realização da colheita por meio da centrifugação da biomassa (vide Figura 29).

Figura 29. Coleta de biomassa microalgal por centrifugação.



Fonte: Próprio autor.

A secagem da biomassa foi realizada em estufa, à temperatura de 60 °C, por 24 h. Triturou-se e homogeneizou-se o material mecanicamente (Figura 30), armazenando-o, finalmente, para posteriores análises quantitativas (ABDELAZIS *et al.*, 2013; D'OCA *et al.*, 2011; GRANADOS *et al.*, 2012; MIAO; WU, 2006; BAUMGARTNER *et al.*, 2013).

Figura 30. Secagem e trituração da biomassa microalgal.



(a) Coleta da biomassa seca.



(b) Biomassa maserada.



(c) Secagem da biomassa.



(d) Biomassa após secagem.

Fonte: Próprio autor.

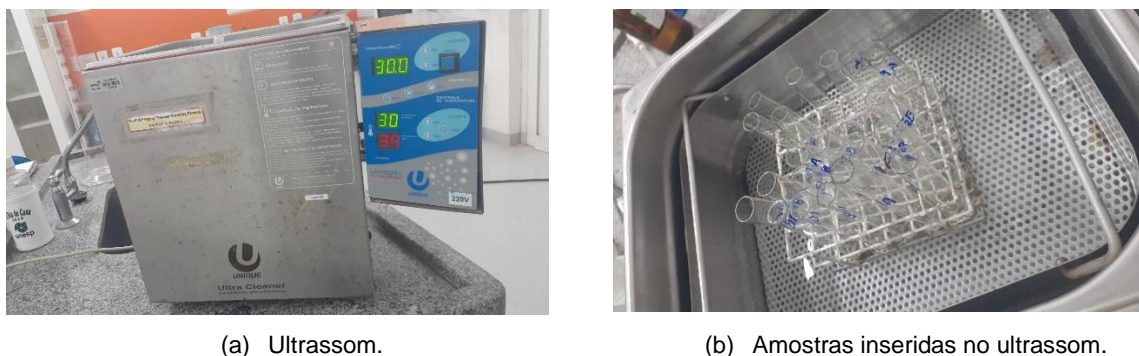
### 3.6. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SECA

#### 3.6.1. Determinação dos Lipídeos Totais

A determinação dos lipídeos totais foi realizada pelo método descrito por Folch *et al.* (1957) adaptado por Hosseini *et al.* (2015). Massa conhecida de microalga ( $m_0$ ) foi misturada a 1,2 ml de uma solução clorofórmio:metanol (2:1 v/v) em um tubo de centrífuga. Em seguida, foi mantido por 30 minutos em ultrassom (Figura 31) e, posteriormente, centrifugado por 15 minutos a 7.000 rpm. O sobrenadante foi disposto em um tubo de massa conhecida ( $m_1$ ), sendo este procedimento repetido por três

vezes. O solvente então foi evaporado a 60 °C e foi obtida a massa do tubo com os lipídeos totais ( $m_2$ ).

Figura 31. Sistema para quebra das células por meio de ultrassom



(a) Ultrassom.

(b) Amostras inseridas no ultrassom.

Fonte: Próprio autor.

A partir dos dados obtidos foi determinado o teor de lipídeos totais ( $LP_T$ ) de acordo com a Eq. (5):

$$LP_T = (m_2 - m_1 m_0) \cdot 100 \quad (5)$$

onde:

$LP_T$ : lipídeos totais (%);

$m_0$  : massa de amostra (g);

$m_1$  : massa de tubo (g);

$m_2$  : massa de tubo com lipídeos totais (g).

### 3.6.2 Determinação do Teor de Proteína

Para determinar a quantidade de proteínas ug/mL ( $PR_T$ ), primeiramente hidrolisou-se uma amostra de 5 mg em solução alcalina com 0,8 ml de NaOH a 1 molar, a qual foi posteriormente aquecida em banho-maria a 95 °C, por 30 min. Na sequência, arrefeceu-se o material em gelo, neutralizando-o, então, em 0,2 ml de solução ácida de HCl a 0,4 molar (MEIJER; WIJFFELS, 1998). Depois quantificou-se a variável pelo reagente, azul-brilhante G-250 (BRADFORD, 1976), estimando-a, finalmente, por curva de calibração ( $y = -0,2605x^2 + 1,1212x - 0,0326$ ) de leituras de absorvância em espectrofotômetro DR-7000 a 595 nm.

### 3.6.3 Determinação do Teor de Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada conforme Peng *et al.* (2001). Para isso, foram acondicionadas em cadinhos vazios, previamente calcinados, amostras de microalga com massa conhecida e obtido ( $P_0$ ). Posteriormente, foram levadas a mufla a 600 °C durante 3 horas. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados até a temperatura ambiente para nova pesagem ( $P_1$ ), seguindo a metodologia de Trevisan (2013).

A partir dos dados obtidos foram determinados o teor de cinzas das amostras ( $CZ_T$ ) de acordo com a Eq. (6):

$$CZ_T = \left( \frac{P_1 - P_0}{P_0} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

### 3.6.4 Determinação do Teor de Carboidratos

Os carboidratos foram obtidos pela diferença entre os componentes da biomassa (GONG *et al.*, 2014). Assim, a partir dos dados obtidos para lipídeos totais, proteínas e cinzas, obteve-se o teor de carboidratos ( $CB_T$ ), de acordo com a Eq. (7):

$$CB_T = 100 - LP_T - PR_T - CZ_T \quad (7)$$

onde:

$CB_T$ : Teor de carboidratos (%);

$LP_T$ : Teor de lipídeos totais (%);

$PR_T$ : Teor de proteínas (%);

$CZ_T$ : Teor de cinzas (%).

## 3.7. ANÁLISE DE DADOS

A análise para descrever os pares de fatores com a maior variabilidade nas variáveis de desempenho técnico da cultura de *C. vulgaris* em água de aquicultura, foi realizada antes da abordagem de traçado de contornos 2D e metodologia de superfície-resposta para modelação explicativa.

Para otimizar, tanto a previsão como a visualização de padrões não booleanos, através de estrutura de fio cromática, foi utilizada uma lógica *fuzzy* para desligar

qualquer probabilidade de enviesamento dos dados de alta dimensão, através do *software* “R-project”, cuja programação multi-paradigma proporciona um ambiente de fácil utilização para computação estatística e confecção de gráficos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PROPRIEDADES DO SUBSTRATO

A análise de superfície de resposta prediz com precisão os pares de fatores com a maior variabilidade com relação às propriedades físico-químicas do meio de cultivo pelo meio e fonte de água de aquicultura. Este método de aplicação de análise descritiva possibilitou prever adequadamente o efeito interativo entre o tempo de cultivo e as fontes de nutrientes sobre as variáveis de desempenho como pH, amônia e turbidez.

A Tabela 11 mostra uma análise de superfície-resposta de propriedades físico-químicas de meio de cultivo de microalga e fonte de água de aquicultura nos meios de cultivo Illman, APBD, APAD e AR nas concentrações de 5%, 20%, 35% e 50%, levando-se em consideração o tempo de amostragem, visto que as concentrações não apresentaram efeito significativo para as variáveis pH, amônia e turbidez.

Os valores relativamente baixos de  $r_{adj}^2$  apresentados na Tabela 11 são devidos a complexidade da composição de meio. Explicá-la, perfeitamente, pela relação de interdependência de tempo e fonte, seria impossível, pois há inúmeras causas especiais abióticas e bióticas envolvidas, dentre elas: condições de transporte, armazenamento e regularidade de amostragem.

Na Tabela 11, também se verifica que o fator tempo, influenciou, positivamente, pH e  $NH_3$ , mas, negativamente, turbidez. Portanto, os meios de cultivo, Illman, APBD, APAD e AR, tornaram-se mais alcalinos e concentrados em íons de N, porém, menos turvos, ao final de cultivo. O fator fonte de água residuária aquícola influenciou, positivamente, o pH e a turbidez, mas, negativamente, a  $NH_3$ . Portanto, sistemas de ranicultura e piscicultura intensiva produziram substratos mais básicos e translúcidos, enquanto no meio de referência Illman foram produzidos substratos mais ácidos e opacos.

Tabela 11. Análise de superfície-resposta de propriedades físico-químicas de meio de cultivo de microalga e fonte de água de aquicultura.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	p >   t	$r_{adj}^2$
<b>pH</b>				0,4430
$\beta_0$ , intercepto	5,5270	0,0970	<2,765e <sup>-16</sup> **	
$\beta_x$ , tempo	0,0085	0,0340	0,7975	
$\beta_y$ , fonte	0,2395	0,0800	0,0030**	
$B_x\beta_y$	-0,0190	0,0065	0,0060**	
$\beta_{x^2}$	0,0080	0,0055	0,1355	
$\beta_{y^2}$	-0,0105	0,0155	0,5015	
<b>Amônia (mg/l)</b>				0,1310
$\beta_0$ , intercepto	0,5010	0,1085	9,005e <sup>-6</sup> **	
$\beta_x$ , tempo	0,1115	0,0380	0,0035**	
$\beta_y$ , fonte	-0,1050	0,0895	0,2415	
$B_x\beta_y$	-0,0190	0,0075	0,0115*	
$\beta_{x^2}$	-0,0170	0,0060	0,0070**	
$\beta_{y^2}$	0,0330	0,0170	0,0585	
<b>Turbidez (abs.)</b>				0,4845
$\beta_0$ , intercepto	0,1780	0,0425	5,465e <sup>-5</sup> **	
$\beta_x$ , tempo	-0,0440	0,0150	0,0035**	
$\beta_y$ , fonte	0,1005	0,0350	0,0050**	
$B_x\beta_y$	0,0080	0,0030	0,0080**	
$\beta_{x^2}$	0,0055	0,0025	0,0220*	
$\beta_{y^2}$	-0,0105	0,0070	0,1310	

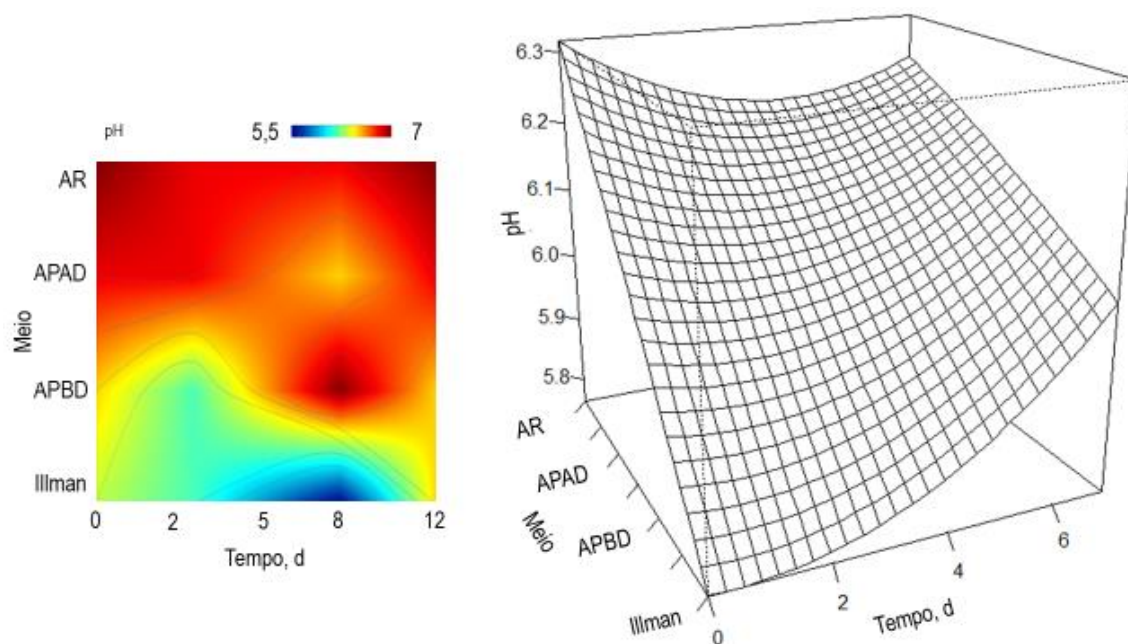
Códigos de significância: \*\*p <0,010; \*p >0,050.

Fonte: Próprio autor.

Globalmente, houve interação de tempo e fonte no que diz respeito ao pH, turbidez e amônia. Combiná-los, para otimização de qualidade físico-química do cultivo, seria, portanto, exequível conforme pode ser observado nas Figuras 32, 33 e 34 apresentadas a seguir.

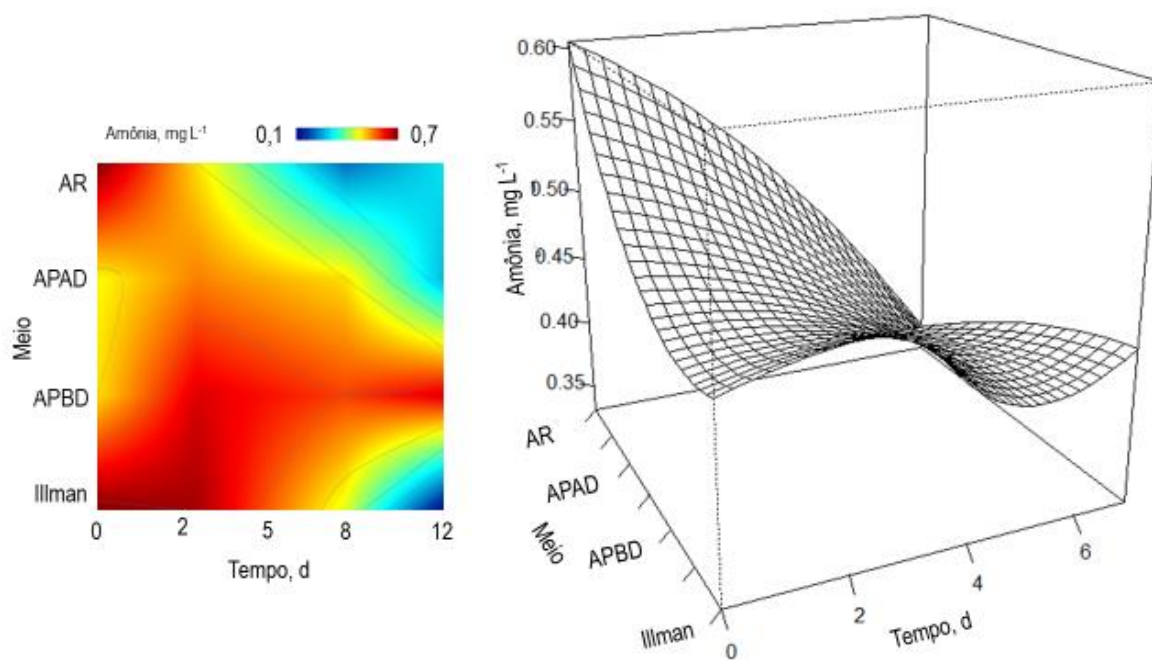


Figura 32. Características do pH em função do tempo de cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



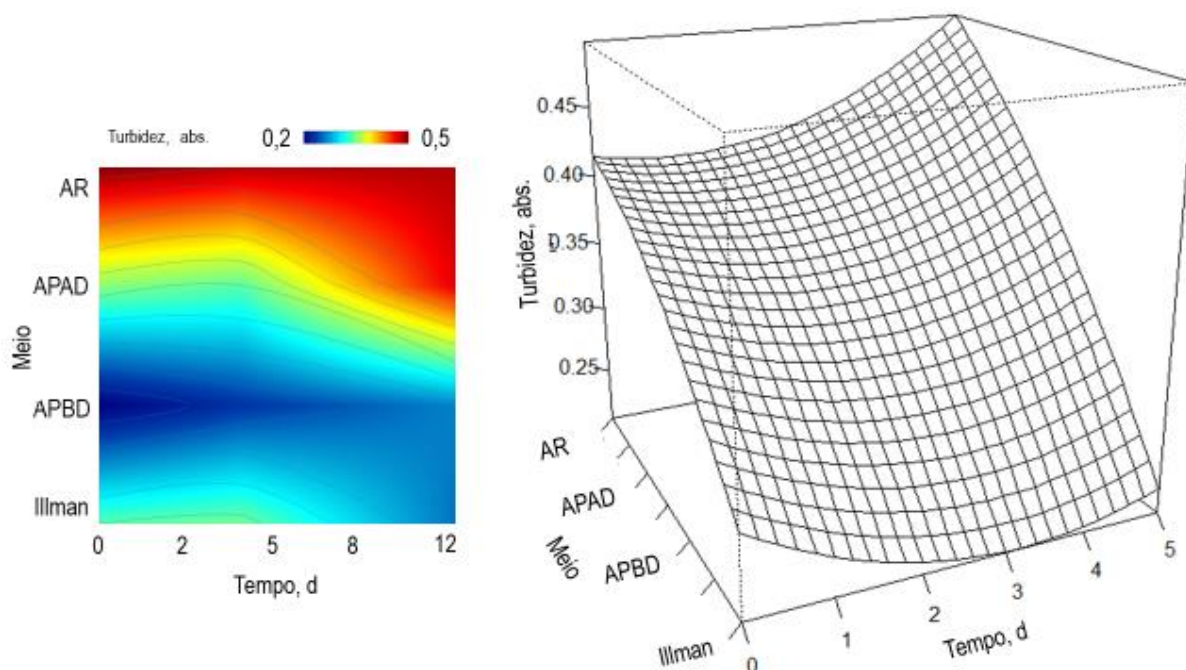
Fonte: Próprio autor.

Figura 33. Características da amônia em função do tempo de cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



Fonte: Próprio autor.

Figura 34. Características da turbidez em função do tempo cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



Fonte: Próprio autor.

No que diz respeito ao pH alguns autores relatam que, o pH influencia na taxa de difusão de  $\text{CO}_2$  e na acessibilidade a nutrientes essenciais ao crescimento específico e concentração de biomassa (valores inferiores a 5,0, ou superiores a 9,0, inibem, consideravelmente, fotossíntese e rotas bioquímicas associadas à síntese de carboidratos, lipídeos e proteínas). Por isso, é completamente possível regular produção de óleo, estressando as microalgas pela adição de substâncias no meio que alteram concentração de íons de hidrogênio em solução (SUTHAR; VERMA, 2018; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2016). Tais fatos corroboram aos resultados apresentados na Figura 32 onde o tratamento em que foi utilizado o meio com APBD demonstrou um aumento nos valores de pH com o passar do tempo de cultivo, evidenciando, desta maneira, uma maior e melhor difusão de oxigênio no meio e, portanto, uma maior eficiência fotossintética e, conseqüentemente, absorção dos nutrientes disponíveis.

No que diz respeito à amônia (Figura 33), nos tratamentos com AR e APAD é provável que o cultivo de microalgas absorveu a amônia rapidamente, mesmo que a concentração inicial da mesma tenha sido baixa, devido ao bom desempenho e

adaptação das microalgas, que proporcionaram uma condição favorável à absorção de nutrientes, já que estudos com microalgas da espécie *C. vulgaris* têm mostrado que níveis de  $\text{NH}_4^+$  superiores a 4,0 g/l inibem o crescimento drasticamente (CALIXTO *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2018; GENTILI, 2014; HENA *et al.*, 2015; JEBALI *et al.*, 2015; KLIGERMAN; BOUWER, 2015; LAM; LEE, 2012; MANDAL; MALLICK, 2009; RAMIREZ *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2017). Segundo Volschan Jr. *et al.* (2009), a amônia está presente em solução na forma de íon ( $\text{NH}_4^+$ ) e na forma livre não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), porém, quando o pH está próximo a 9,5, a presença de ambos  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$  está próxima a um equilíbrio (aproximadamente 50% de  $\text{NH}_3$  e 50% de  $\text{NH}_4^+$ ). Já com  $\text{pH} < 7$ , a amônia é encontrada na forma de  $\text{NH}_4$ , o que explica a tentativa sem sucesso de detectar nitrato e nitrito durante todo o cultivo.

Por isso, é completamente natural que microalgas sob condições de privação nitrogenada idênticas proporcionem distintos percentuais de lipídeos (PRUVOST *et al.*, 2011). As pesquisas de Heidari; Farhadian; Mahboobi (2011) e Hesni (2020) sobre produção de biomassa e ficoremediação de amônia, nitrato e nitrito em efluente de piscicultura por *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, enfatizam o alto potencial das espécies estudadas na remoção dos nutrientes, sendo que a *Chorella vulgaris* removeu 93,67% de amônia; 92,23% de nitrato e 89,3% de nitrito.

No que diz respeito a turbidez, conforme mostra a Figura 34, o meio AR é o mais turvo em relação aos demais meios de aquicultura, que possuem maior transparência. Diante disso, ocorreu uma menor incidência de luz no meio, provocando uma menor concentração de biomassa e clorofila, o que pode vir a afetar a produtividade de lipídeo final e perfil de ácidos graxos, fato que se dá pela forte correlação existente entre as duas variáveis (turbidez/lipídeo), conforme identificado em várias pesquisas (CHOI; JANG; KAN, 2018; CHOKSHI *et al.*, 2016; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017; HENA *et al.*, 2015).

## 4.2 DESEMPENHO TÉCNICO DE CULTIVO

A análise de superfície de resposta, trata-se de um método de aplicação de análise descritiva que possibilitou prever adequadamente o efeito interativo entre a concentração de água de aquicultura e as fontes em biomassa seca, lipídeos, carboidratos e proteínas, conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 12. Análise de superfície-resposta de desempenho cultivo de microalga pela fonte e concentração de água de aquicultura.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	p >   t	r <sub>adj</sub> <sup>2</sup>
<b>Biomassa seca (mg/l)</b>				0,1470
β <sub>0</sub> , intercepto	0,3460	0,0430	5,415e <sup>-10**</sup>	
β <sub>x</sub> , concentração	-0,0005	0,0015	0,7025	
β <sub>y</sub> , fonte	-0,0565	0,0320	0,0830	
Bxβ <sub>y</sub>	-0,0005	0,0005	0,3410	
β <sub>x</sub> <sup>2</sup>	1,995e <sup>-5</sup>	2,675e <sup>-5</sup>	0,4710	
β <sub>y</sub> <sup>2</sup>	0,0150	0,0060	0,0150*	
<b>Lipídeos (%)</b>				0,4445
β <sub>0</sub> , intercepto	32,4330	2,8815	2,925e <sup>-14**</sup>	
β <sub>x</sub> , concentração	0,0350	0,1140	0,7610	
β <sub>y</sub> , fonte	-1,7695	2,1210	0,4090	
Bxβ <sub>y</sub>	0,0420	0,0210	0,0550	
β <sub>x</sub> <sup>2</sup>	-0,0015	0,0015	0,3550	
β <sub>y</sub> <sup>2</sup>	-0,2915	0,4010	0,4710	
<b>Carboidratos (%)</b>				0,6940
β <sub>0</sub> , intercepto	14,9905	6,5410	0,0270*	
β <sub>x</sub> , concentração	0,2885	0,2590	0,2720	
β <sub>y</sub> , fonte	13,9550	4,8145	0,0060**	
Bxβ <sub>y</sub>	-0,1565	0,0485	0,0025**	
β <sub>x</sub> <sup>2</sup>	-0,0005	0,0040	0,8850	
β <sub>y</sub> <sup>2</sup>	-0,3435	0,9105	0,7075	
<b>Proteínas (%)</b>				0,5795
β <sub>0</sub> , intercepto	52,4310	6,1125	8,875e <sup>-11**</sup>	
β <sub>x</sub> , concentração	-0,3250	0,2420	0,1870	
β <sub>y</sub> , fonte	-12,1640	4,4990	0,010**	
Bxβ <sub>y</sub>	0,1135	0,0450	0,0160*	
β <sub>x</sub> <sup>2</sup>	0,0025	0,0035	0,5440	
β <sub>y</sub> <sup>2</sup>	0,6320	0,8510	0,4615	

Códigos de significância: \*\*p <0,010; \*p >0,050.

Fonte: Próprio autor.

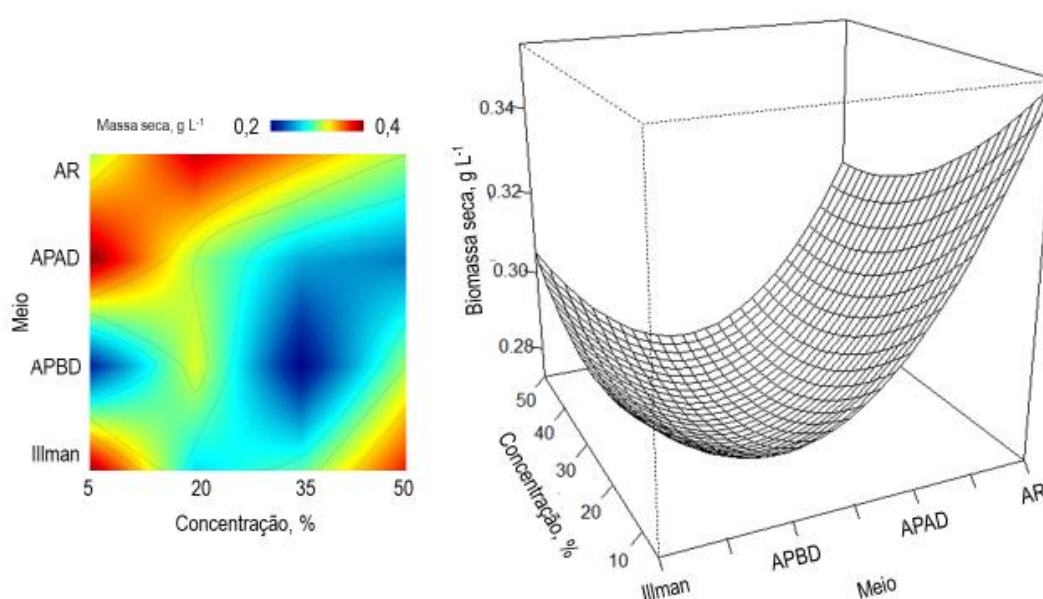
Observa-se na Tabela 12 que houve efeito negativo de fonte em biomassa seca, lipídeos e proteínas, porém, positivo, em relação a carboidratos. A melhor opção de substrato alternativo à produção de material graxo seria, portanto, APBD. A concentração influenciou, negativamente, biomassa seca e proteínas, mas, positivamente, lipídeos e carboidratos. Seria, portanto, possível produzir biomassa

otimamente a 5–20 % de concentração. Foi verificado que houve interação de fatores APAD a 5 % e AR a 20 %, maximizando a produção de biomassa seca (0,35 e 0,40 mg/l, respectivamente), conforme serão mostrados em figuras a seguir.

Explicam-se os resultados obtidos pelos significativos decréscimos de  $\text{NH}_3$  e turbidez, e significativa produção de clorofila. Illman a 35 % e APBD a 5 % produziram os maiores teores de lipídeos totais (29,50 e 26,10 %), respectivamente. A composição nutricional do substrato alternativo foi, portanto, incapaz de promover estoques de grânulos lipídicos, focos de produção de biodiesel, bio-óleo, biosurfactantes, etc... Sendo o meio equilibrado, então, não há estresse o suficiente para estimulá-los. O desempenho de AR a 5 % exemplifica incapacidade de águas residuárias aquícolas de intensificar síntese de triacilgeróis, ácidos graxos livres, etc..., mas tem potencialidade para produção de hidratos de carbono, substratos de industrialização de bioetanol, biogás e bioprodutos de valor agregado. APBD a 50 % otimizou produção de proteínas, viáveis à fabricação de alimentos funcionais e rações animais.

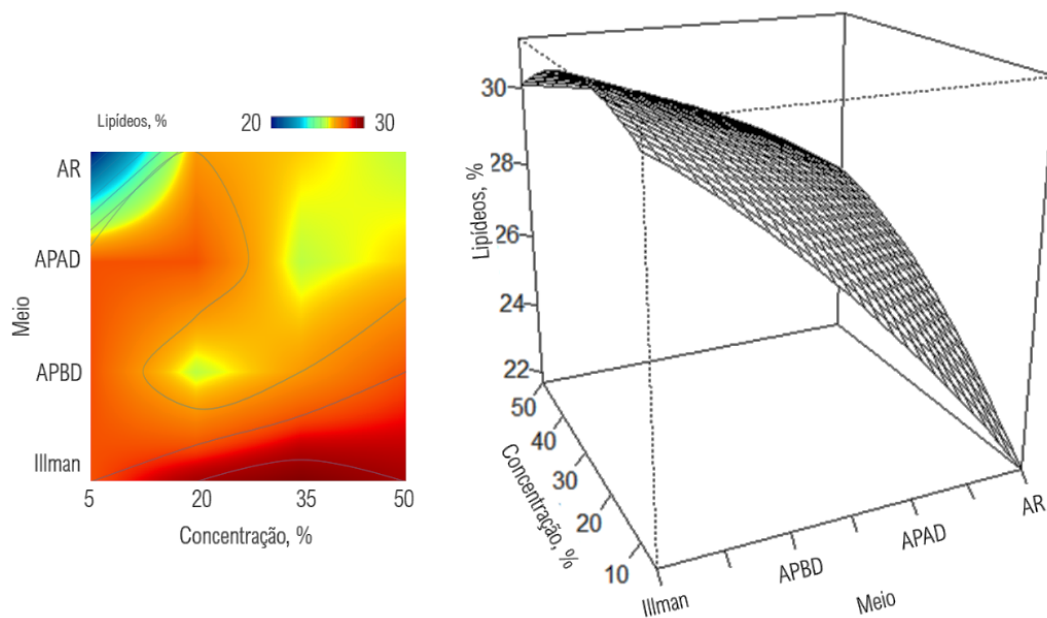
As Figuras 35, 36, 37 e 38 mostram, respectivamente, teores de biomassa seca, lipídeos, carboidratos e proteínas, em função da concentração dos meios de cultivo de microalgas (Illman, APBD, APAD e AR).

Figura 35. Produção de biomassa seca em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



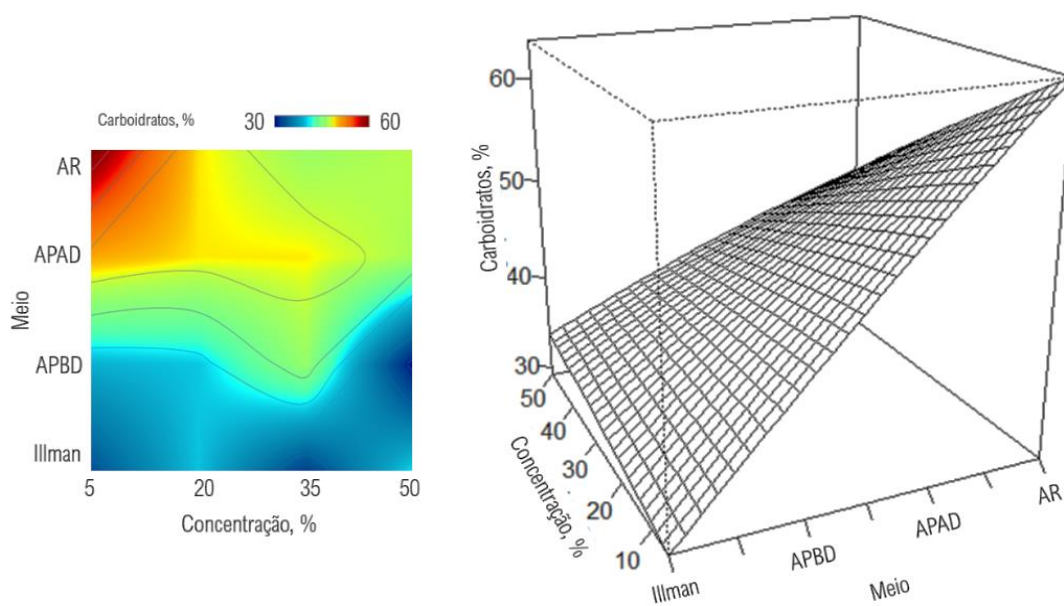
Fonte: Próprio autor.

Figura 36. Porcentagem de lipídeos em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



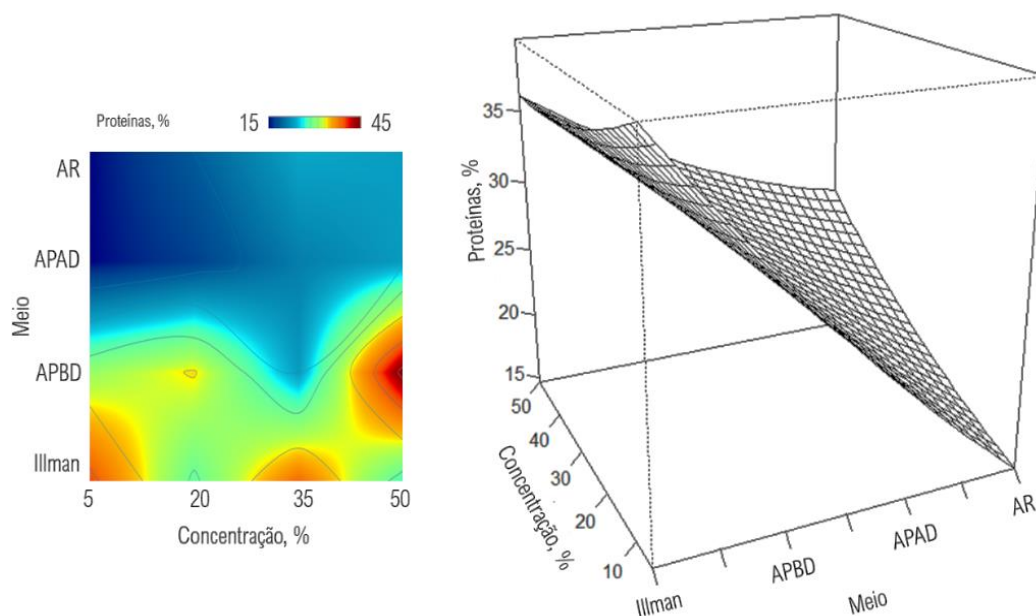
Fonte: Próprio autor.

Figura 37. Porcentagem de carboidratos em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



Fonte: Próprio autor.

Figura 38. Porcentagem de proteínas em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 35, verifica-se que houve maior produção de biomassa seca em águas residuárias de ricultura (AR) com 20% de concentração, sendo que este resultado se justifica pela maior absorção de amônia, conforme já demonstrado, anteriormente. Quando utilizado água de piscicultura de alta densidade (APAD), verifica-se que a concentração de 5% apresentou uma maior produção de biomassa. Portanto, concentrações superiores a faixa ótima, reduziram a eficiência de conversão fotossintética de nutrientes em material microalgal, confirmando o previsto na literatura (FERREIRA, 2019; CHOI; JANG; KAN, 2018; CHOKSHI *et al.*, 2016).

Os autores Woertz *et al.* (2009), Heidari, Farhadan; Mahboobi (2011), Tejido-Núñez *et al.* (2019) e Ramos; Pizarro (2018) relataram o ganho de biomassa e os benefícios nutritivos de diferentes espécies de microalgas cultivadas em efluentes de piscicultura, enfatizando que as diferentes diluições dos meios testados influenciaram significativamente na produção de biomassa final.

Através da Figura 36 foi possível verificar que, assim como para produção de biomassa seca, discutida anteriormente, os tratamentos de 5% AR e APAD de 5% apresentaram uma menor e uma maior produção de lipídeos, respectivamente, demonstrando desta forma a correlação entre as variáveis biomassa e produção lipídica. Essa redução no teor de lipídeos totais deve-se ao fato da restrição de

nitrogênio para o crescimento, como destacado por Perez-Garcia *et al.* (2011), sendo que o nitrogênio em geral possui um efeito positivo ao crescimento e negativo no acúmulo de lipídeos.

Foi possível observar que os valores de lipídeos totais do presente trabalho mantiveram-se entre 22 e 30%, corroborando com Chisti (2007) que apresentou o teor médio de lipídeos em microalgas de aproximadamente 30,5 %, após ter estudado várias espécies, como: *N. oleoabundans*, *C. vulgaris*, *C. emersonii*, *C. minutissima*, *C. sorokiniana*, *C. protothecoides*, *Ankistrodesmus gracilis*, *Botryococcus braunii*, *S. obliquus* e *Desmodesmus subspicatus*, embora ele também tenha relatado ter encontrado valores de lipídeos acima da média (aproximadamente 70%) em amostras de *Neochloris* sp. e *Chlorella* sp.

A alta produtividade de lipídeos e biomassa discutidas anteriormente nas Figuras 36 e 37 também foram comprovadas por alguns autores (CHOI; JANG; KAN, 2018; DIANURSANTI; SISTIAFI; PUTRI, 2018; HENA *et al.*, 2015; IDRIS *et al.*, 2017). Esta produtividade lipídica pode ser comprovada pelo tempo de duplicação da biomassa durante a fase exponencial de crescimento da microalga que é de 3,5 horas dependendo da espécie.

Ferreira *et al.* (2019) caracterizaram seis tipos de microalgas (*Chlorella* sp., *C. vulgaris*, *Desmodesmus* sp., *D. brasiliensis*, *Botryococcus braunii* e *B. terribilis*) quanto aos parâmetros de crescimento, proteínas, carboidratos, lipídeos, cinzas e conteúdo de clorofila e obteve como resultado o terceiro maior teor de lipídeos para *C. vulgaris* que alcançou o valor 21,9%, valor esse próximo ao valor mínimo de 20% de lipídeos obtidos no presente trabalho.

Observando-se a Figura 37, nota-se que a maior porcentagem de carboidratos foi encontrada na concentração de 5% de águas residuárias de ranicultura, sendo que, baseados nestes valores, é possível concluir que quanto maior a produção lipídica ou menor produção de carboidratos, menor será a taxa de produção de biomassa. Uma maneira simples de compreender esta relação é que o aumento de lipídeos ocorre quando o crescimento é interrompido, pois o carbono utilizado anteriormente para a síntese de proteína pode agora ser armazenado como lipídeos (McGINNIS, 1997).

De acordo com a Figura 38, observa-se maior produção de proteínas no cultivo com o meio APBD na concentração de 50%. Isto é devido à correlação em ter



proteína, carboidrato e lipídeo, onde uma menor produção de lipídeo e carboidrato resulta em uma maior concentração proteica.

Obviamente, íons de N são componentes de síntese de aminoácidos, blocos construtores de proteínas. Houve, portanto, relações lineares significativas entre propriedades de substrato e variáveis de desempenho de cultivo. Se pH e NH<sub>3</sub> aumentassem, marginalmente, haveria ganhos de 18,345 e 18,495 % em carboidratos, mas perdas de 13,41 e 19,67 % em proteínas, de acordo com a Tabela 13, na qual AIC e BIC são indicativos de qualidade à critérios de informação de Akaike e Bayesiano. Nota-se, também, que o aumento unitário em turbidez adicionaria 3.460,9 µg/l à concentração de clorofilas.

Tabela 13. Análise de regressão linear múltipla de produção de biomoléculas por propriedades físico-químicas de meio de cultivo alternativo de água de aquicultura.

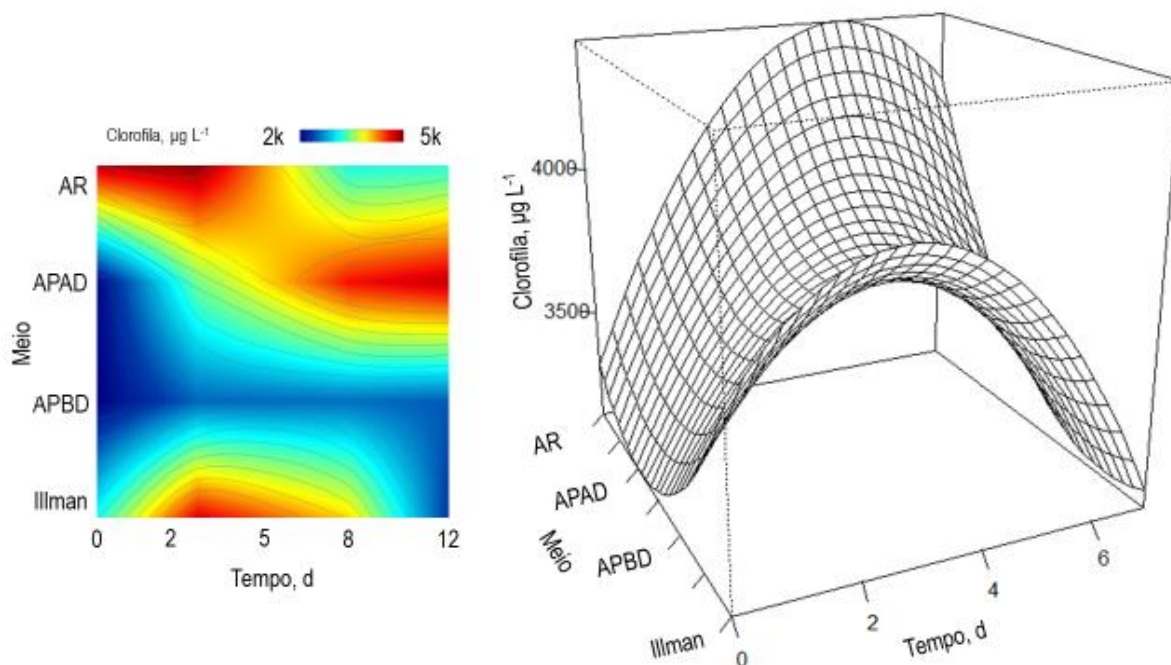
Biomolécula	Modelo, $y = \beta_0 + \beta x_1 + \beta x_2 + \dots + \beta x_n$	AIC	BIC	$r_{adj}^2$
Carboidratos	$C_{HOS} (\%) = -88,300^{**} + 18,345 \text{ pH}^{**} + 18,495 \text{ NH}_3^* + 34,775 (\text{Turbidez}^*)$	341,40	349,30	0,50
Proteínas	$P_{ro} (\%) = 129,420^{**} - 13,410 \text{ pH}^{**} - 19,670 \text{ NH}_3^{**} - 30,555 (\text{Turbidez}^{**})$	308,20	316,20	0,60
Clorofila	$C_{lo} (\mu\text{g/l}) = 12.402,800^{**} - 1.445,700 \text{ pH}^* - 3.111,300 \text{ NH}_3 + 3.460,900 (\text{Turbidez})$	812,20	820,20	0,20

Códigos de significância: \*\*p <0,010; \*p >0,050.

Fonte: Próprio autor.

A Figura 39 mostra a produção de clorofila em função do tempo cultivo de microalga em cada um dos meios utilizados.

Figura 39. Produção de clorofila em função do tempo de cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 39, observa-se uma maior produção de pigmentos fotossintéticos no início do cultivo para o tratamento de AR e ao final do cultivo para o tratamento APAD. Já para o tratamento de APBD, essa produção manteve-se constante durante todo o tempo de cultivo. O mesmo aconteceu com relação a turbidez (Figura 34), o que prova que quanto mais turvo o meio, menor incidência luminosa e menor a taxa fotossintética, como já discutido no presente trabalho.

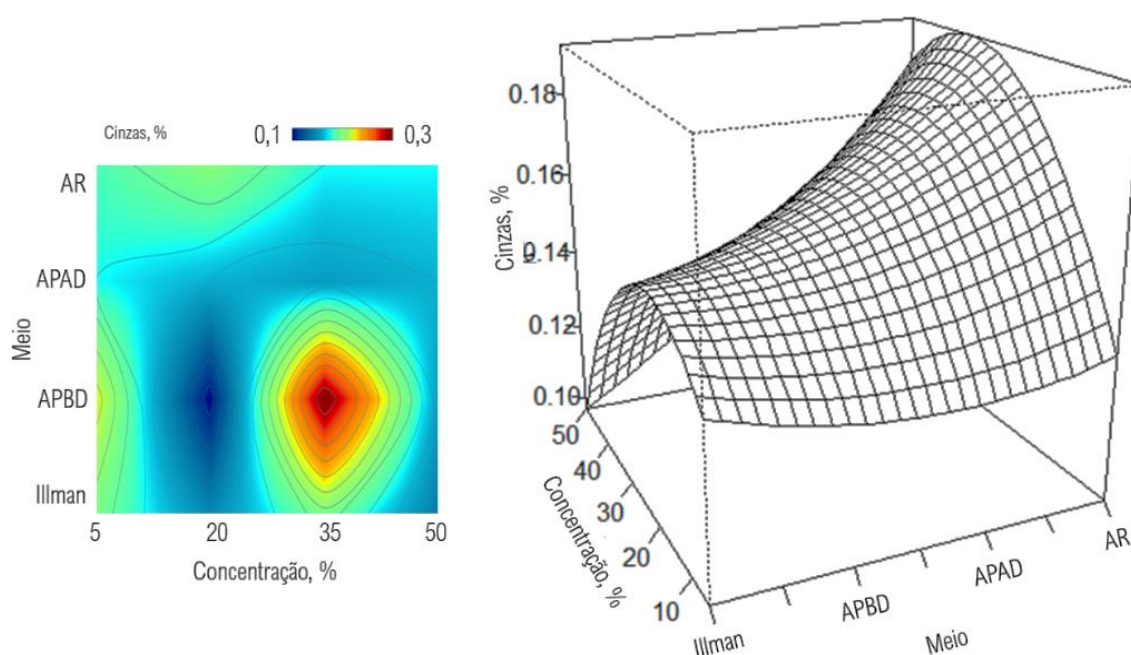
As concentrações de clorofila total são respostas ao desenvolvimento da microalga durante o período de cultivo, bem como as condições do ambiente. Assim, para a clorofila total aspectos importantes devem ser considerados, tais como, o aumento da entrada de luz no meio com a redução da cor, pois o excesso de luz pode prejudicar a célula ocasionando uma decomposição de cloroplastos; o *stress* oxidativo; e a redução da disponibilidade de nitrogênio no meio na fase tardia do seu crescimento (HE *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos estão em concordância com aqueles obtidos por Raposo *et al.* (2010) que estudaram a utilização da microalga *C. vulgaris* no tratamento de efluentes, em diferentes diluições (1:2, 1:1 e 100% de efluente), observando ao final

de 20 dias de cultivo a maior e menor concentrações de clorofila, para as diluições 1:1 e 1:2 de efluente, respectivamente.

A Figura 40 mostra a porcentagem de cinzas em função da concentração no cultivo de microalgas em cada um dos meios utilizados.

Figura 40. Porcentagem de cinzas em função da concentração no cultivo de microalgas nos meios Illman, APBD, APAD e AR.



Fonte: Próprio autor.

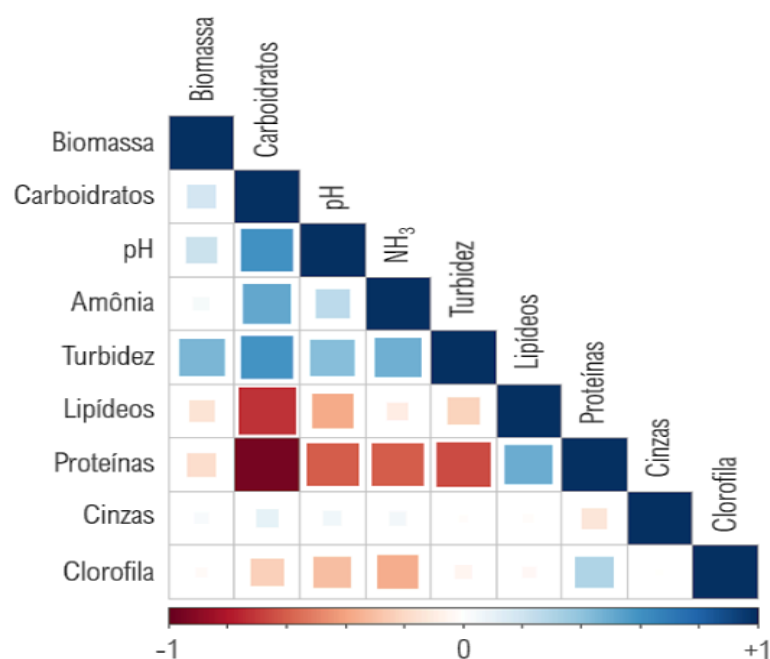
Observando-se a Figura 40 nota-se que o teor de cinzas apresentou uma maior concentração no caso da utilização do meio com 35% águas residuárias de piscicultura de baixa densidade (APBD). Estes dados corroboram com os autores Gong *et al.* (2014) que relataram que os baixos valores de cinzas são importantes, pois os mesmos são características de um elevado teor de compostos que podem ser destinados para a produção de biocombustíveis, alimentação e nutrição.

#### 4.3 ASSOCIAÇÕES DE PROPRIEDADES DE SUBSTRATO E VARIÁVEIS DE DESEMPENHO DE CULTIVO

Biomassa e turbidez se correlacionaram, positivamente quanto maior for a densidade fitoplanctônica, mais turvo o meio, pois, células são barreiras físicas à transmitância (Figura 41). Lipídeos e carboidratos se correlacionaram, negativamente,

a proteína. Portanto, não há possibilidade de otimizá-los, simultaneamente. Água residuária de ranicultura maximizou carboidratos e, obviamente, minimizou lipídeos e proteínas, coerentemente. Proteínas e  $\text{NH}_3$  se correlacionaram, negativamente, portanto uma maior uma maior produção de proteína foi gerada no meio com uma menor concentração de amônia.

Figura 41. Relações lineares entre propriedades de meio e variáveis de desempenho de cultivo de microalga em águas de aquicultura.



Fonte: Próprio autor.

Xie *et al.* (2013) observaram que, embora promova síntese de lipídeos, uma limitada disponibilidade de nutrientes afeta o ritmo de crescimento específico e, conseqüentemente, a produtividade de biomassa. Por isso, orienta-se promovê-la, cautelosamente. Sistemas de cultivo organizados em etapas complementares de restrição e suplementação nutricionais possibilitam ótimos rendimentos de lipídeos e biomassa, mas simultaneamente apresenta uma insatisfatória concentração celular inicial, devido à oferta controlada de nitratos e fosfatos, o que é, posteriormente, compensado pela aplicação de nutrientes em fase exponencial.

Esses dados são semelhantes aos encontrados por Kim *et al.* (2013) que verificaram que, após a extração dos lipídeos destinados à produção de biodiesel, tem-se uma biomassa ainda com uma importante quantidade de carboidratos e

proteínas que podem ser destinados à produção de etanol e/ou de rações para alimentação animal.

## 5. CONCLUSÃO

A tecnologia de produção de microalgas com uso de água de aquicultura com sistema de fotobioreatores é um bom caminho para cenário bioenergético. Com isto, conclui-se que:

- A melhor opção de substrato alternativo à produção de material graxo para a produção de biodiesel de terceira geração seria APAD (Águas Residuárias de Piscicultura de Alta Densidade) na concentração de 5%;
- O cultivo de microalga em APBD (Águas Residuárias de Piscicultura de Baixa Densidade) otimizou a produção de proteínas na concentração de 50 %, viabilizando a fabricação de alimentos funcionais e rações animais.
- A AR (Água Residuárias de Ranicultura) na concentração de 5%, é um meio, com boa potencialidade de produção de hidratos de carbono, substratos de industrialização de bioetanol, biogás e bioprodutos de valor agregado;
- APAD a 5 % e AR a 20 % maximizaram a produção de biomassa seca, 0,35 e 0,40 mg/l, respectivamente;
- Os maiores teores de lipídeos totais (29,50 e 26,10 %, respectivamente) foram obtidos nos meios Illman a 35 % e APBD a 5 %.

Adicionalmente, o efluente de aquicultura diluído pode ser uma via eficiente para o cultivo de *C. vulgaris*, para o uso em fotobioreator, pois sua diluição, associada com o meio de cultivo, pode reduzir a turbidez do efluente, assegurando, ao mesmo tempo, a disponibilidade de recursos energéticos para alimentar adequadamente as células.

Assim, a integração destas técnicas é capaz de assegurar tanto a exequibilidade como a viabilidade do efluente de aquicultura como um meio alternativo para maximizar a produção de biomassa coletável e, conseqüentemente, de lipídeos, proteínas e clorofilas, para potencialmente produzir biocombustíveis de terceira geração, rações e produtos químicos finos.

Os resultados desta tese são oportunos e de grande relevância quando se trata do desenvolvimento e implementação prática de estratégias destinadas à reutilização de efluentes ricos em nutrientes no cultivo de microalgas de forma viável. Porém, investigações adicionais na engenharia de fotobioreatores, tecnologias de ponta para

colheita e extração de lipídeos, devem ser aprofundadas em futuros trabalhos de pesquisa.

Dentre outros aspectos a serem considerados para a continuação deste trabalho de pesquisa podem ser destacados os seguintes:

- Análise e exploração de outros compostos de interesse, como fósforo e nitrogênio;
- Determinação de lipídeos neutros, composição em ácidos graxos das microalgas produzidas em resíduo de aquicultura;
- Análise do cultivo após injeção de gás carbônico;
- Aumento da escala e aplicação de fotoperíodo nos cultivos que apresentaram melhores resultados de produção de lipídeos;
- Avaliação da diminuição da DBO e DQO do resíduo de aquicultura antes e após o cultivo de microalgas.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL HAMID, S. H.; LANANAN, F.; DIN, W. N. S.; LAM, S. S.; KHATOON, H.; ENDUT, A.; JUSOH, A. Harvesting microalgae, *Chlorella* sp. by bioflocculation of *Moringa oleifera* seed derivatives from aquaculture wastewater phytoremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 95, Pt. A, p. 270–275, 2014.
- ABDELAZIZ, A. E. M.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels. **Environmental Technology**, Abingdon, v. 34, n. 13/14, p. 1807–1836, 2013.
- ADESANYA, V. O.; CADENA, E.; SCOTT, S. A.; SMITH, A. G. Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 163, p. 343–355, 2014.
- ABDUL RAZACK, S.; DURAIARASAN, S.; SANTHALIN SHELLOMITH, A. S.; MURALIKRISHNAN, K. Statistical optimization of harvesting *Chlorella vulgaris* using a novel bio-source, *Strychnos potatorum*. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 7, p. 150–156, 2015.
- AGBAKPE, M.; GE, S.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; KOBYLARZ, P. Algae harvesting for biofuel production: Influences of UV irradiation and polyethyleneimine (PEI) coating on bacterial biocoagulation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 166, p. 266–272, 2014.
- ALAM, M. A.; VANDAMME, D.; CHUN, W.; ZHAO, X.; FOUBERT, I.; WANG, Z.; MUYLAERT, K.; YUAN, Z. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Dordrecht, v. 15, n. 4, p. 573–583, 2016.
- ALAM, M. A.; WAN, C.; GUO, S. -L.; ZHAO, X. -Q.; HUANG, Z. -Y.; YANG, Y. -L.; CHANG, J. -S.; BAI, F. -W. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 118, n. 1, p. 29–33, 2014.
- AL-LWAYZY, S. H.; YUSAF, T.; AL-JUBOORI, R. A. Biofuels from the fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for diesel engines. **Energies**, Basel, v. 7, n. 3, p. 1829–1851, 2014.
- ALUKDER, M. R.; DAS, P.; WU, J. C. Immobilization of microalgae on exogenous fungal mycelium: A promising separation method to harvest both marine and freshwater microalgae. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 91, p. 53–57, 2014.
- ALVAREZ, P.; SALGUEIRO, J. L.; PEREZ, L.; CANCELA, A.; SANCHEZ, A.; ORTIZ, L. Total use of microalgae as feedstock for biodiesel and pellet production. **International Journal of Environmental Research**, Tehran, v. 10, n. 4, p. 637–644, 2016.



AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, Oxford, v. 88, n. 10, p. 3402–3410, 2011.

AMOS, W. **Updated cost analysis of photobiological hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* Green Algae**. Milestone Completion Report. National Renewable Energy Laboratory. NREL/MP-560-35593, Contract n° DE-AC36-99-GO10337, 2004. 32 p. Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35593.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2019.

ANDRADE, D. S.; FILHO-COLOZZI, A. **Microalgas de águas continentais, potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2014.

ANTUNES, R.; SILVA, I. C. **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis**. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 2010. Disponível em: <https://inpi.justica.gov.pt/Portals/6/PDF%20INPI/Eco-tecnologias/Utilizac%CC%A7a%CC%83o%20de%20algas%20para%20a%20producao%CC%A7a%CC%83o%20de%20biocombusti%CC%81veis.pdf?ver=2017-08-28-110418-200>. Acesso em: 16 fev. 2019.

ARCHANAA, S.; JOSE, S.; MUKHERJEE, A.; SURAIHKUMAR, G. K. Sustainable diesel feedstock: A comparison of oleaginous bacterial and microalgal model systems. **Bioenergy Research**, New York, v. 12, n. 1, p. 205–216, 2019.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. High quality biodiesel and its diesel engine application: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 1999–2008, 2010.

ATTA, M.; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 148, p. 373–378, 2013.

BABEL, S.; TAKIZAWA, S. Microfiltration membrane fouling and cake behavior during algal filtration. **Desalination**, Amsterdam, v. 261, n. 1, p. 46–51, 2010.

BANERJEE, C.; GHOSH, S.; SEN, G.; MISHRA, S.; SHUKLA, P.; BANDOPADHYAY, R. Study of algal biomass harvesting using cationic guar gum from the natural plant source as flocculant. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 675–681, 2013.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; BAUMGARTNER, D.; ZANIN, G. M.; ARROYO, P. A. Biomass production and ester synthesis by *in situ* transesterification/esterification using the microalga *spirulina platensis*. **International Journal of Chemical Engineering**, London, v. 2013, Article ID 425604, 7 p. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/425604>. Acesso em: 12 mar. 2019.

BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. *In*: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (ed.). **Microalgal biotechnology**. Cambridge:

Cambridge University Press, 1988, p. 222-255. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000072&pid=S0101-2061200300010000300001&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000072&pid=S0101-2061200300010000300001&lng=pt). Acesso em: 12 abr. 2019.

BENMOUSSA-DAHMEN, I.; CHTOUROU, H.; REZGUI, F.; SAYADI, S.; DHOUIB, A. Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in *Amphora subtropica* and *Dunaliella* sp. for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 218, p. 816–825, 2016.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. **Revisão**: biotecnologia de microalgas. Curitiba, PR. 2008. Disponível em: [ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/alimentos/article/viewFile/11804/8320](https://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/alimentos/article/viewFile/11804/8320). Acesso em: 05 jun. 2019.

BHOWMICK, G.; SUBRAMANIAN, G.; MISHRA, S.; SEN, R. Raceway pond cultivation of a marine microalga of Indian origin for biomass and lipid production: A case study. **Algal Research**, Amsterdam, v. 6, p. 201–209, 2014.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, 1-3, p. 313-321, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, p. 248-254, 1976.

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**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BRENTNER, L. B.; BECKELMAN, M.; ZIMMERMAN, J. B. Life cycle analysis of algal biodiesel. a model to guide process design for industrial production. center for green chemistry & green engineering at yale. *In*: ANNUAL ALGAL BIOMASS SUMMIT, 4, Arizona. **Proceedings of the [...]**. Arizona: Phoenix, 2010.

BROWN, T. M.; DUAN, P.; SAVAGE, P. E. Hydrothermal Liquefaction and Gasification of *Nannochloropsis* sp. **Energy & Fuels**, Washington, v. 24, n. 6, p. 3639–3646, 2010.

CALIXTO, C. D.; DA SILVA SANTANA, J. K.; DE LIRA, E. B.; SASSI, P. G. P.; ROSENHAIM, R.; DA COSTA SASSI, C. F.; DA CONCEIÇÃO, M. M.; SASSI, R. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 221, p. 438–446, 2016.

CHA, T. S.; CHEN, J. W.; GOH, E. G.; AZIZ, A.; LOH, S. H. Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae oils for biodiesel application. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 22, p. 10633–10640, 2011.

CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Oil production by six microalgae: impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 2697–2705, 2016.

CHAUDHARY, L.; PRADHAN, P.; SONI, N.; SINGH, P.; TIWARI, A. Algae as a feedstock for bioethanol production: new entrance in biofuel world. **International Journal of Chemical Technology Research**, Faisalabad, v. 6, n. 2, p. 1381–1389, 2014.

CHEIRSILP, B.; THAWECHAI, T.; PRASERTSAN, P. Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 241, p. 787–794, 2017.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 110, p. 510–516, 2012.

CHEN, C. -Y.; BAI, M. -D.; CHANG, J. -S. Improving microalgal oil collecting efficiency by pretreating the microalgal cell wall with destructive bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 81, p. 170–176, 2013.

CHENG, C. -H.; DU, T. -B.; PI, H. -C.; JANG, S. -M.; LIN, Y. -H.; LEE, H. -T. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 21, p. 10151–10153, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHO, H. -S.; OH, Y. -K.; PARK, S. -C.; LEE, J. -W.; PARK, J. -Y. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. **Renewable Energy**, v. 54, p. 156–160, 2013.

CHOI, S. -A.; OH, Y. -K.; JEONG, M. -J.; KIM, S. W.; LEE, J. -S.; PARK, J. -Y. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. **Renewable Energy**, London, v. 65, p. 169–174, 2014.

CHOI, Y. -K.; JANG, H. M.; KAN, E. Microalgal biomass and lipid production on dairy effluent using a novel microalga, *Chlorella* sp. isolated from dairy wastewater. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 23, n. 3, p. 333–340, 2018.

CHOJNACKA, K. W.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 3, n. 1, p. 21–34. 2004.

CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Microalgal biomass generation by phycoremediation of dairy industry wastewater: An integrated approach towards sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 221, p. 455–460, 2016.

COLLET, P.; HÉLIAS, A.; LARDON, L.; RAS, M.; GOY, R. -A.; STEYER, J. -P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 207–214, 2011.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146–1151, 2009.

DENG, X.; GAO, K.; ADDY, M.; CHEN, P.; LI, D.; ZHANG, R.; LU, Q.; MA, Y.; CHENG, Y.; LIU, Y.; RUAN, R. Growing *Chlorella vulgaris* on mixed wastewaters for biodiesel feedstock production and nutrient removal. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Amsterdam, v. 93, n. 9, p. 2748–2757, 2018.

DENG, X. -Y.; GAO, K.; ZHANG, R. -C.; ADDY, M.; LU, Q.; REN, H. -Y.; CHEN, P.; LIU, Y. -H.; RUAN, R. Growing *Chlorella vulgaris* on thermophilic anaerobic digestion swine manure for nutrient removal and biomass production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 243, p. 417–425, 2017.

DE-BASHAN, L. E.; MORENO, M.; HERNANDEZ, Y. B. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella Vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, Oxford, v. 36, p. 2941–2948, 2001.

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

DIANURSANTI, I.; PUTRI, D. N. Biodiesel synthesis from *nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* through transesterification process using NaOH/zeolite heterogeneous catalyst. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 105, p. 012053, 2018.

DÍAZ-SANTOS, E.; VILA, M.; DE LA VEGA, M.; LEÓN, R.; VIGARA, J. Study of bioflocculation induced by *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and flocculating protein factors in microalgae. **Algal Research**, Amsterdam, v. 8, p. 23–29, 2015.

D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES J. S.; MIYASAKI E. K.; MORON-VILLARREYES, J. A.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, p. 1533–1538, 2011.

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. **Journal Applied Phycology**, Dordecht, v. 21, p. 111–117, 2009.

DRIRA, N.; PIRAS, A.; ROSA, A.; PORCEDDA, S.; DHAOUADI, H. Microalgae from domestic wastewater facility's high rate algal pond: Lipids extraction, characterization and biodiesel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 206, p. 239–244, 2016.

DURAND, E.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 115, n. 4, p. 379–385, 2013.

ELLISON, C. R.; OVERA, S.; BOLDOR, D. Central composite design parameterization of microalgae/cyanobacteria co-culture pretreatment for enhanced lipid extraction using an external clamp-on ultrasonic transducer. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 51, p. 496–503, 2019.

EL SHIMI, H. I.; MOUSTAFA, S. S. Biodiesel production from microalgae grown on domestic wastewater: Feasibility and Egyptian case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 82, p. 4238–4244, 2018.

ELUMALAI, S.; PRAKASAM, V.; SELVARAJAN, R. Optimization of abiotic conditions suitable for the production of biodiesel from *Chlorella vulgaris*. **Indian Journal of Science and Technology**, Chennai, v. 4, p. 91–97, 2011.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 9, p. 1525–1536, 2008.

FAN, J.; CUI, Y.; WAN, M.; WANG, W.; LI, Y. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, n. 1, p. 17, 2014.

FAN, J.; HUANG, J.; LI, Y.; HAN, F.; WANG, J.; LI, X.; WANG, W.; LI, S. Sequential heterotrophy–dilution–photoinduction cultivation for efficient microalgal biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 112, p. 206–211, 2012.

FAST, A.; BOYD, C. Water circulation, aeration and other management practices. *In*: FAST, A.; LESTER, J. (ed.). **Marine shrimp culture: principles and practices**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992. p. 457–495.

FERREIRA, G. F.; RÍOS PINTO, L. F.; CARVALHO, P. O.; COELHO, M. B.; EBERLIN, M. N.; MACIEL FILHO, R.; FREGOLENTE, L. V. Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella* and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-019-00566-3>. Acesso em: 15 jun. 2019.

FISHMAN, D.; MAJUNDAR, R.; MORELLO J.; PATE, R.; YANG, J. (ed.). **National algal biofuels technology roadmap**. Maryland: Office of Energy Efficiency and Renewable Energy - Biomass Program, 2010. 110 p. U.S. Department of Energy. Disponível em:

[http://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/algal\\_biofuels\\_roadmap.pdf](http://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/algal_biofuels_roadmap.pdf). Acesso em: 15 jun. 2019.

FORTMAN, J. L., S. CHHABRA, A. MUKHOPADHYAY, H. CHOU, T. S. LEE, E. STEEN, AND J. D. KEASLING. Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. **Trends Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 375–381, 2008.

FRANCISCO, É. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 395–403, 2010.

FRANCO, T.; VIGGI, C. C.; PAGNANELLI, F.; TORO, L. Development of an integrated process for bio-oil production from microalgae. **Chemical Engineering Transactions**, Milan, v. 24, p. 1237–1242, 2011.

GE, S.; CHAMPAGNE, P.; PLAXTON, W. C.; LEITE, G. B.; MARAZZI, F. Microalgal cultivation with waste streams and metabolic constraints to triacylglycerides accumulation for biofuel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 325–343, 2017.

GENTILI, F. G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 169, p. 27–32, 2014.

GERKEN, H. G.; DONOHOE, B.; KNOSHAUG, E. P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. **Planta**, Heidelberg, v. 237, n. 1, p. 239–253, 2013.

GHERNAOUT, D.; GHERNAOUT, B. On the concept of the future drinking water treatment plant: algae harvesting from the algal biomass for biodiesel production – A review. **Desalination and Water Treatment**, Abingdon, v. 49, n. 1–3, p. 1–18, 2012.

GHIMIRE, A.; KUMAR, G.; SIVAGURUNATHAN, P.; SHOBANA, S.; SARATALE, G. D.; KIM, H. W.; LUONGO, V.; ESPOSITO, G.; MUNOZ, R. Bio-hythane production from microalgae biomass: Key challenges and potential opportunities for algal bio-refineries. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 241, p. 525–536, 2017.

GIRALDO CALDERÓN, N. D.; DÍAZ BAYONA, K. C.; ATEHORTÚA GARCÉS, L. Immobilization of the green microalga *Botryococcus braunii* in polyester wadding: effect on biomass, fatty acids, and exopolysaccharide production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 80–87, 2018.

GOLE, V. L.; GOGATE, P. R. A review on intensification of synthesis of biodiesel from sustainable feed stock using sonochemical reactors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Amsterdam, v. 53, p. 1–9, 2012.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, Amsterdam, v. 24, p. 403–415, 2017.

GONG, X. *et al.* Investigation on pyrolysis of low lipid microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*. **Energy Fuel**, Washington, v. 28, p. 95-103, 2014.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 25, n. 4, p. 991–999, 2013.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 269–274, 2009.

GRANADOS, M. R.; ACIÉN, F. G.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 118, p. 102–110, 2012.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuel's priority list: A review of the technological challenges. **Journal of The Royal Society Interface**, London, v. 7, n. 46, p. 703–726, 2010.

GULTOM, S. O.; HU, B. Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. **Energies**, Basel, v. 6, n. 11, p. 5921–5939, 2013.

GUMBI, S. T.; MAJEKE, B. M.; OLANIRAN, A. O.; MUTANDA, T. isolation, identification and high-throughput screening of neutral lipid producing indigenous microalgae from South African aquatic habitats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, v. 182, n. 1, p. 382–399, 2017.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M. H. M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, K.; WIJFFELS, R. H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, New York, v. 33, n. 2, p. 243–260, 2015.

GUO, S.-L.; ZHAO, X.-Q.; WAN, C.; HUANG, Z.-Y.; YANG, Y.-L.; ASRAFUL ALAM, Md.; HO, S.-H.; BAI, F.-W.; CHANG, J.-S. Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 285–289, 2013.

GUPTA, P. L.; LEE, S.-M.; CHOI, H.-J. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 31, n. 9, p. 1409–1417, 2015.

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 178–185, 2011.

HARITH, Z. T.; YUSOFF, F. M.; MOHAMED, M. S.; SHARIFF, M.; DIN, M.; ARIFF, A. B. Effect of different flocculants on the flocculation performance of flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, n. 21, 2009.

HEIDARI, S. A.; FARHADIAN, O.; MAHBOOBI, S. N. Biomass Production and ammonia and nitrite removal from fish farm effluent by *Scenedesmus quadricauda* culture. **Journal of Environmental Studies**, Ellicot City, v. 37, p. 7–9, 2011.

HENA, S.; FATIHAH, N.; TABASSUM, S.; ISMAIL, N. Three stage cultivation process of facultative strain of *Chlorella sorokiniana* for treating dairy farm effluent and lipid enhancement. **Water Research**, Oxford, v. 80, p. 346–356, 2015.

HEO, Y. M.; LEE, H.; LEE, C.; KANG, J.; AHN, J.-W.; LEE, Y. M.; KANG, K.-Y.; CHOI, Y.-E.; KIM, J.-J. An integrative process for obtaining lipids and glucose from *Chlorella vulgaris* biomass with a single treatment of cell disruption. **Algal Research**, Amsterdam, v. 27, p. 286–294, 2017.

HESNI, M. A.; HEDAYATI, A.; QADERMARZI, A.; POULADI, M.; ZANGIABADI, S.; NAQSHBANDI, N. Using *Chlorella vulgaris* and iron oxide nanoparticles in a designed bioreactor for aquaculture effluents purification. **Aquacultural Engineering**, Amsterdam, v. 90, 2020.

HONG, J. W.; KIM, O. H.; JO, S. W.; KIM, H.; JEONG, M. R.; PARK, K. M.; YOON, H. S. Biochemical composition of a Korean domestic microalga *Chlorella vulgaris* KNUA027. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 44, p. 400–407, 2016.

HOSSEINI, N. S. Microalgae cultivation in a novel top-lit gas-lift open bioreactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 192, p. 432-440, 2015.

HU, B.; ZHOU, W.; MIN, M.; DU, Z.; CHEN, P.; MA, X.; LIU, Y.; LEI, H.; SHI, J.; RUAN, R. Development of an effective acidogenically digested swine manure-based algal system for improved wastewater treatment and biofuel and feed production. **Applied Energy**, Oxford, v. 107, p. 255–263, 2013.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, Chichester, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

HUANG, Y.; HONG, A.; ZHANG, D.; LI, L. Comparison of cell rupturing by ozonation and ultrasonication for algal lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. **Environmental Technology**, Abingdon, v. 35, n. 8, p. 931–937, 2014.

IDRIS, N. A.; LOH, S. K.; LAU, H. L. N.; MUZALINA, E.; E.; VELLO, V.; TAN, C. Y.; PHANG, S. M. Cultivation of microalgae in medium containing palm oil mill effluent and its conversion into biofuel. **Journal of Oil Palm Research**, Kuala Lumpur, p. 9, 2017.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p. 631–635, 2000.



JAZZAR, S.; QUESADA-MEDINA, J.; OLIVARES-CARRILLO, P.; MARZOUKI, M. N.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E.; SMAALI, I. A whole biodiesel conversion process combining isolation, cultivation and in situ supercritical methanol transesterification of native microalgae. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 190, p. 281–288, 2015.

JEBALI, A.; ACIÉN, F. G.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MHIRI, N.; KARRAY, F.; DHOUIB, A.; MOLINA-GRIMA, E.; SAYADI, S. Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 198, p. 424–430, 2015.

JI, M. -K.; KIM, H. -C.; SAPIREDDY, V. R.; YUN, H. -S.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; CHOI, J.; LEE, W.; TIMMES, T. C.; INAMUDDIN; JEON, B. -H. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 97, n. 6, p. 2701–2710, 2013.

JONES, J.; MANNING, S.; MONTOYA, M.; KELLER, K.; POENIE, M. Extraction of algal lipids and their analysis by HPLC and mass spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urban, 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-012-2044-8>. Acesso em: 21 abr. 2019.

JOURDAN, J. P. Grow your own Spirulina. *In: MANUAL of small-scale spirulina culture*. French: Antenna Technologies, p. 1-16, 2001.

KAMM, B.; KAMM, L. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

KANDILIAN, R.; PRUVOST, J.; LEGRAND, J.; PILON, L. Influence of light absorption rate by *Nannochloropsis oculata* on triglyceride production during nitrogen starvation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 163, p. 308–319, 2014.

KHUDHAIR, A. M.; FARID, M. M. A review on energy conservation in building applications with thermal storage by latent heat using phase change materials. **Energy Conversion and Management**, London, v. 45, n. 2, p. 263–275, 2004.

KIM, G. -Y.; YUN, Y.-M.; SHIN, H. -S.; HAN, J. -I. Cultivation of four microalgae species in the effluent of anaerobic digester for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 224, p. 738–742, 2017.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 52, p. 1834–1846, 2015.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D. P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 144, p. 499–503, 2013.

- KUMAR, K.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S.; YANG, J. -W. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 51, p. 875–885, 2015.
- KUMAR, V.; NARENDRAKUMAR, G.; THYAGARAJAN, R.; MELCHIAS, G. A comparative analysis of biodiesel production and its properties from *Leptolyngbya* sp. BI-107 and *Chlorella vulgaris* under heat shock stress. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 502–506, 2018.
- LAL, A.; DAS, D. Biomass production and identification of suitable harvesting technique for *Chlorella* sp. MJ 11/11 and *Synechocystis* PCC 6803. **3 Biotech**, Klampenborg, v. 6, n. 1, p. 41, 2016.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Applied Energy**, Oxford, v. 94, p. 303–308, 2012.
- LEE, D. -H.; BAE, C. Y.; HAN, J. -I.; PARK, J. -K. In situ analysis of heterogeneity in the lipid content of single green microalgae in alginate hydrogel microcapsules. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, n. 18, p. 8749–8756, 2013.
- LEE, K.; CHANTRASAKDAKUL, P.; KIM, D.; KONG, M.; PARK, K. Y. Ultrasound pretreatment of filamentous algal biomass for enhanced biogas production. **Waste Management**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 1035–1040, 2014.
- LEE, O. K.; OH, Y. -K.; LEE, E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 196, p. 22–27, 2015.
- LIAU, B. -C.; SHEN, C. -T.; LIANG, F. -P.; HONG, S. -E.; HSU, S. -L.; JONG, T. -T.; CHANG, C. -M. J. Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 169–175, 2010.
- LIM, J. K.; CHIEH, D. C. J.; JALAK, S. A.; TOH, P. Y.; YASIN, N. H. M.; NG, B. W.; AHMAD, A. L. **Rapid Magnetophoretic Separation of Microalgae**, Weinheim, v. 8, n. 11, p. 1683–1692, 2012.
- LIU, Z.-Y.; WANG, G.-C.; ZHOU, B.-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 11, p. 4717–4722, 2008.
- LOHMAN, E. J.; GARDNER, R. D.; HALVERSON, L.; MACUR, R. E.; PEYTON, B. M.; GERLACH, R. An efficient and scalable extraction and quantification method for algal derived biofuel. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 235–244, 2013.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MA, G.; HU, W.; PEI, H.; JIANG, L.; JI, Y.; MU, R. Study of KOH/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as heterogeneous catalyst for biodiesel production via in situ transesterification from microalgae. **Environmental Technology**, Abingdon, v. 36, n. 5, p. 622–627, 2015.

MACKAY, S.; GOMES, E.; HOLLIGER, C.; BAUER, R.; SCHWITZGUÉBEL, J. -P. Harvesting of *Chlorella sorokiniana* by co-culture with the filamentous fungus *Isaria fumosorosea*: A potential sustainable feedstock for hydrothermal gasification. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 185, p. 353–361, 2015.

MALCATA, F. X. Microalgae and biofuels: a promising partnership? **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 542–549, 2011.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 84, n. 2, p. 281–291, 2009.

MANDIK, Y. I.; CHEIRSILP, B.; BOONSAWANG, P.; PRASERTSAN, P. Optimization of flocculation efficiency of lipid-rich marine *Chlorella* sp. biomass and evaluation of its composition in different cultivation modes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 182, p. 89–97, 2015.

MANDOTRA, S. K.; KUMAR, P.; SUSEELA, M. R.; NAYAKA, S.; RAMTEKE, P. W. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 201, p. 222–229, 2016.

MARANDUBA, H. L.; ROBRA, S.; NASCIMENTO, I. A.; DA CRUZ, R. S.; RODRIGUES, L. B.; ALMEIDA NETO, J. A. De. Improving the energy balance of microalgae biodiesel: Synergy with an autonomous sugarcane ethanol distillery. **Energy**, New York, v. 115, p. 888–895, 2016.

MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C.; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e co-produtos**. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/andrebmariano/artigo-3-comparao-de-meios-de-cultivo-autotrficos-mixotrficos-e-heterotrficos-para-produo-de-biomassa-de-microalgas-com-foco-em-biocombustveis-e-coprodutos>. Acesso em: 20 jun. 2019.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATHIMANI, T.; SENTHIL KUMAR, T.; CHANDRASEKAR, M.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. **Renewable Energy**, Oxford, v. 105, p. 637–646, 2017.

MCMILLAN, J. R.; WATSON, I. A.; ALI, M.; JAAFAR, W. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. **Applied Energy**, Oxford, v. 103, p. 128–134, 2013.

MEIJER, E. A.; WIJFFELS, R. H. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. **Biotechnology Techniques**, [s.l.], v. 12, p. 353-358, 1998.

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

MING LV, J.; HUA, C. L.; HUA, X., ZHANG, L.; LIN CHEN, H. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 6797-6804, 2010.

MONTEGGIA, L. O; TESSELE, F. **Remoção físico-química de algas e fósforo de efluentes de lagoas de alta taxa**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. v. 2, p. 97-102, 2001. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/PROSAB/livros/coletanea2/ART11.pdf>. Acesso em: 12 br. 2019.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F. G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 113–131, 2001.

MORADI-KHEIBARI, N.; AHMADZADEH, H.; HOSSEINI, M. Use of solvent mixtures for total lipid extraction of *Chlorella vulgaris* and gas chromatography FAME analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 9, p. 1363–1373, 2017.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 7, p. 117–123, 2015.

MURADOV, N.; TAHA, M.; MIRANDA, A. F.; WREDE, D.; KADALI, K.; GUJAR, A.; STEVENSON, T.; BALL, A. S.; MOURADOV, A. Fungal-assisted algal flocculation: application in wastewater treatment and biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, n. 1, p. 24, 2015.

NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; HE, N.; XIAO, Z.; XIE, Y.; CHANG, J.-S.; LIN, L.; LU, Y. Microalgae biomass harvesting by bioflocculation-interpretation by classical DLVO theory. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 101, p. 160–167, 2015.

NDIMBA, B. K.; NDIRIMBA, R. J.; JOHNSON, T. S.; WADITEE-SIRISATTHA, R.; BABA, M.; SIRISATTHA, S.; SHIRAIWA, Y.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 93, p. 234–244, 2013.

ONAY, M.; SONMEZ, C.; OKTEM, H. A.; YUCEL, A. M. Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: Isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 169, p. 62–71, 2014.

PAN, Y.; ALAM, M. A.; WANG, Z.; HUANG, D.; HU, K.; CHEN, H.; YUAN, Z. One-step production of biodiesel from wet and unbroken microalgae biomass using deep eutectic solvent. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 238, p. 157–163, 2017.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MISHRA, S. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 179, p. 565–572, 2015.

PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 24, n. 15, p. 13437–13451, 2017.

PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 349–355, 2010.

PENG, W.; WU, Q.; TU, P. Pyrolytic characteristics of heterotrophic *Chlorella protothecoides* for renewable bio-fuel production. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 13, p. 5-12, 2001.

PÉREZ, L.; SALGUEIRO, J. L.; MACEIRAS, R.; CANCELA, Á.; SÁNCHEZ, Á. An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 97, p. 20–26, 2017.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

PIEBER, S.; SCHOBBER, S.; MITTELBAACH, M. Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 47, p. 474–482, 2012.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 781–796, 2013.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 9, n. 3, p. 165–177, 2009.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, Heidelberg, v. 53, n. 2, p. 150–154, 2011.

PROCHAZKOVA, G.; KASTANEK, P.; BRANYIK, T. Harvesting freshwater *Chlorella vulgaris* with flocculant derived from spent brewer's yeast. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 177, p. 28–33, 2015.

PRUVOST, J.; VOOREN, G. van; LE GOUIC, B.; COUZINET-MOSSION, A.; LEGRAND, J. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 150–158, 2011.

QUINLAN, A. V. Prediction of the optimum pH for ammonia-N oxidation by *Nitrosomonas Europaea*. In well-aerated natural and domestic-waste waters. **Water Research**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 561–566, 1984.

RAHUL, R.; KUMAR, S.; JHA, U.; SEN, G. Cationic inulin: A plant based natural biopolymer for algal biomass harvesting. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 72, p. 868–874, 2015.

RAMOS, R.; PIZARRO, R. Growth and bioremediation capacity of *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola Lalandi* (*Perciformes: Carangidae*). **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, Vina del Mar, v. 53, n. 1, p. 75–86, 2018.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O.; RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp. in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 5, p. 630–635, 2014.

RASHID, N.; UR REHMAN, M. S.; SADIQ, M.; MAHMOOD, T.; HAN, J. -I. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 40, p. 760–778, 2014.

RAWAT, I.; BHOLA, V.; KUMAR, R. R.; BUX, F. Improving the feasibility of producing biofuels from microalgae using wastewater. **Environmental Technology**, Abingdon, v. 34, n. 13–14, p. 1765–1775, 2013.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. New York: Blackwell Science, 2004. 545 p.

RICHMOND, A.; CHENG-WU, Z.; ZARMI, Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 20, p. 229–226, 2003.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.

- ROY, S.; DAS, D. Biohythane production from organic wastes: present state of art. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 23, n. 10, p. 9391–9410, 2016.
- SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. -Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, Amsterdam, v. 3, p. 61–65, 2014.
- SALAMA, E. -S.; KURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; EL-DALA TONY, M. M.; YANG, I.-S.; MIN, B.; JEON, B. -H. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 79, p. 1189–1211, 2017.
- SALIM, S.; BOSMA, R.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 23, n. 5, p. 849–855, 2011.
- SALIM, S.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 118, p. 49–55, 2012.
- SATHISH, A.; SIMS, R. C. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 118, p. 643–647, 2012.
- SERENOTTI, F.; CRESPI, B. A.; TORRES, L. D. G. Contribuição à modelagem e simulação da produção de *Spirulina maxima* em fotobioreatores. **Revista Universal Rural**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 8-17, 2004.
- SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; AMINI KHOEYI, Z. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 721–726, 2011.
- SHARMA, A. K.; SAHOO, P. K.; SINGHAL, S.; JOSHI, G. Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 216, p. 793–800, 2016.
- SHEN, X.-F.; CHU, F.-F.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Biosynthesis of high yield fatty acids from *Chlorella vulgaris* NIES-227 under nitrogen starvation stress during heterotrophic cultivation. **Water Research**, Oxford, v. 81, p. 294–300, 2015.
- SHENG, J.; VANNELA, R.; RITTMANN, B. E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 1697–1703, 2011.
- SHI, J.; PODOLA, B.; MELKONIAN, M. Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 154, p. 260–266, 2014.

SIERRA, E.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA, J. L.; GONZÁLEZ, C.; MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 136–147, 2008.

SINGH, B.; GULDHE, A.; RAWAT, I.; BUX, F. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 29, p. 216–245, 2014.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on algal growth: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 38, p. 172–179, 2014.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticaba: FUNEP, 1995. 70 p. Boletim técnico, 1.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 172–215, 2013.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 53, p. 29–38, 2013.

SLEGGERS, P. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A. J. B. Design scenarios for flat panel photobioreactors. **Applied Energy**, Oxford, v. 88, n. 10, p. 3342–3353, 2011.

SMITH-BÄDORF, H. D.; CHUCK, C. J.; MOKEBO, K. R.; MACDONALD, H.; DAVIDSON, M. G.; SCOTT, R. J. Bioprospecting the thermal waters of the Roman baths: isolation of oleaginous species and analysis of the FAME profile for biodiesel production. **AMB Express**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-9>. Acesso em: 12 jul. 2020.

SOMNUK, K.; PRASIT, T.; PRATEEPCHAIKUL, G. Effects of mixing technologies on continuous methyl ester production: Comparison of using plug flow, static mixer, and ultrasound clamp. **Energy Conversion and Management**, London, v. 140, p. 91–97, 2017.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 4316–4342, 2012.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D.; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Nannochloris oleabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 155, p. 204–212, 2014.



- SUTHAR, S.; VERMA, R. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. **Process Safety and Environmental Protection**, London, v. 113, p. 141–148, 2018.
- SYDNEY, E. B.; DA SILVA, T. E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A. C.; DE CARVALHO, J. C.; WOICIECOHWSKI, A. L.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, Oxford, v. 88, n. 10, p. 3291–3294, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 609 p.
- TANG, S.; QIN, C.; WANG, H.; LI, S.; TIAN, S. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 44–49, 2011.
- TEJIDO-NUÑEZ, Y.; AYMERICH, E.; SANCHO, L.; REFARDT, D. Treatment of aquaculture effluent with *Chlorella vulgaris* and *Tetradesmus obliquus*: The effect of pretreatment on microalgae growth and nutrient removal efficiency. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 136, p. 1–9, 2019.
- TAYLOR, R. L.; RAND, J. D.; CALDWELL, G. S. Treatment with algae extracts promotes flocculation, and enhances growth and neutral lipid content in *nannochloropsis oculata* – A candidate for biofuel production. **Marine Biotechnology**, New York, v. 14, n. 6, p. 774–781, 2012.
- TRAN, D.-T.; YEH, K.-L.; CHEN, C.-L.; CHANG, J.-S. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 108, p. 119–127, 2012.
- TREVISAN, E. **Produção de biomassa algácea em vinhaça visando a produção de ésteres etílicos por reação *in situ***. 2013. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- TRUSSELL, R. P. The percent un-ionized ammonia in aqueous ammonia solutions at different pH levels and temperatures. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, New York, v. 29, p. 1505-1507, 1972.
- TÜCCAR, G.; AYDIN, K. Evaluation of methyl ester of microalgae oil as fuel in a diesel engine. **Fuel**, Oxford, v. 112, p. 203–207, 2013.
- UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, p. 012701, 2010.
- UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, 2008.
- UMMALYMA, S. B.; GNANSOUNOU, E.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; SAHOO, D. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of

microalgae – An overview. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 242, p. 227–235, 2017.

UNC, A.; MONFET, E.; POTTER, A.; CAMARGO-VALERO, M. A.; SMITH, S. R. Note to Editor: Microalgae cultivation for wastewater treatment and biofuel production: a bibliographic overview of past and current trends. **Algal Research**, Amsterdam, v. 24, p. 2–7, 2017.

UNTERLANDER, N.; CHAMPAGNE, P.; PLAXTON, W. C. Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, Amsterdam, v. 25, p. 439–444, 2017.

URSU, A.-V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUELIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 157, p. 134–139, 2014.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 233–239, 2013.

VANDAMME, D.; PONTES, S. C. V.; GOIRIS, K.; FOUBERT, I.; PINOY, L. J. J.; MUYLAERT, K. Evaluation of electro-coagulation–flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, Dordrecht, v. 108, n. 10, p. 2320–2329, 2011.

VASUDEVAN, P.T.; BRIGGS, M. Biodiesel production: current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 421–430, 2008.

VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. **Biomass**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 233–247, 1988.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 3. ed. Belo Horizonte: Ed. da UFMG: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. 452 p.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. Ionic liquid as a promising biobased green solvent in combination with microwave irradiation for direct biodiesel production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 206, p. 150–154, 2016.

WAN GHAZALI, W. N. M.; MAMAT, R.; MASJUKI, H. H.; NAJAFI, G. Effects of biodiesel from different feedstocks on engine performance and emissions: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 51, p. 585–602, 2015.

WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, v. 172, n. 7, p. 3307–3329, 2014.

WANG, W.; ZHOU, W.; LIU, J.; LI, Y.; ZHANG, Y. Biodiesel production from hydrolysate of *Cyperus esculentus* waste by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 136, p. 24–29, 2013.

WOOD, L. W. Chloroform-Methanol extraction chlorophyll. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v. 42, p. 38–43, 1985.

WONG, Y. K.; HO, Y. H.; HO, K. C.; LEUNG, H. M.; YUNG, K. K. L. Maximization of cell growth and lipid production of freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by enrichment technique for biodiesel production. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 24, n. 10, p. 9089–9101, 2017.

WU, Z.; ZHU, Y.; HUANG, W.; ZHANG, C.; LI, T.; ZHANG, Y.; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 110, p. 496–502, 2012.

XAALDI KALHOR, A.; MOHAMMADI NASSAB, A. D.; ABEDI, E.; BAHRAMI, A.; MOVAFEGHI, A. Biodiesel production in crude oil contaminated environment using *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 222, p. 190–194, 2016.

XIA, A.; JACOB, A.; TABASSUM, M. R.; HERRMANN, C.; MURPHY, J. D. Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids through co-fermentation of macro- and micro-algae. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 205, p. 118–125, 2016.

XIA, L.; GE, H.; ZHOU, X.; ZHANG, D.; HU, C. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 144, p. 261–267, 2013.

XIA, L.; RONG, J.; YANG, H.; HE, Q.; ZHANG, D.; HU, C. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 161, p. 402–409, 2014.

XIE, S.; SUN, S.; DAI, S. Y.; S. YUAN, J. Efficient coagulation of microalgae in cultures with filamentous fungi. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 28–33, 2013.

XU, Y.; DING, H.; LUO, C.; ZHENG, Y.; XU, Y.; LI, X.; ZHANG, Z.; SHEN, C.;

YANG, J.; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 159–165, 2011.

YEH, K.-L.; CHANG, J.-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 105, p. 120–127, 2012.

YEN, H. -W.; HU, I. -C.; CHEN, C. -Y.; HO, S. -H.; LEE, D. -J.; CHANG, J. -S. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 135, p. 166–174, 2013.

YOO, C.; JUN, S. -Y.; LEE, J. -Y.; AHN, C. -Y.; OH, H. -M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. S71–S74, 2010.

ZHANG, L. Effect of lignin, cellulose and hemicellulose on calcium looping behavior of CaO-based sorbents derived from extrusion-spherization method. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 334, p. 2520–2529, 2018.

ZHANG, S.; LIU, P.; YANG, X.; HAO, Z.; ZHANG, L.; LUO, N.; SHI, J. Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 66, p. 197–203, 2014.

ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; PURUHITO, E.; CHEN, Y. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 14, p. 5297–5304, 2010.

ZHENG, H.; GAO, Z.; YIN, J.; TANG, X.; JI, X.; HUANG, H. Harvesting of microalgae by flocculation with poly ( $\gamma$ -glutamic acid). **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 112, p. 212–220, 2012.

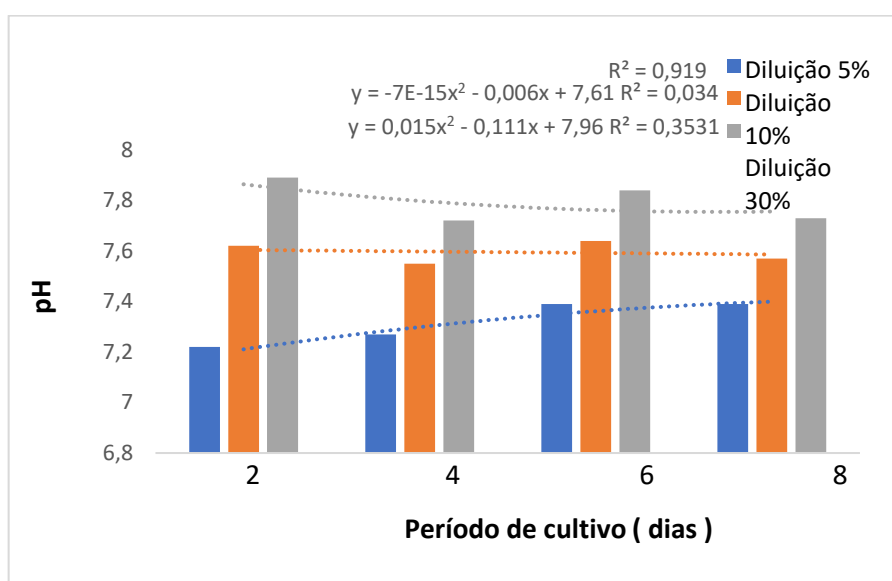
ZHU, L. -D.; LI, Z. -H.; GUO, D. -B.; HUANG, F.; NUGROHO, Y.; XIA, K. Cultivation of *Chlorella* sp. with livestock waste compost for lipid production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 223, p. 296–300, 2017.

## APÊNDICE A

### TESTES PRELIMINARES REALIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E DILUIÇÕES

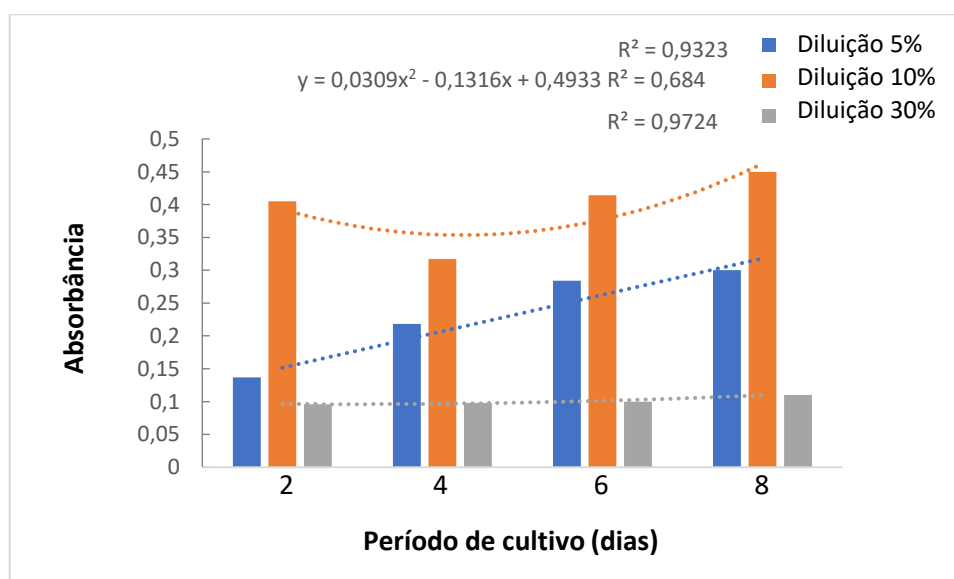
As Figuras 42 a 47 mostram, respectivamente, o monitoramento dos valores de pH, absorbância, amônia, nitrato, nitrito e crescimento celular, de acordo com o tempo de cultivo e para diferentes diluições utilizando o meio Illman.

Figura 42. Monitoramento do pH no meio de cultivo em diferentes diluições.



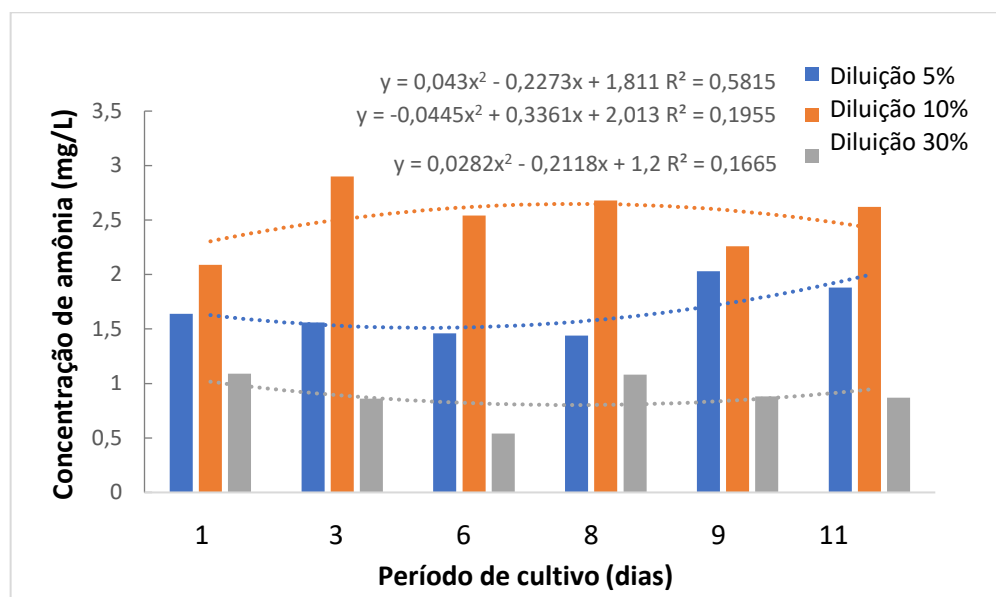
Fonte: Próprio autor.

Figura 43. Monitoramento da absorbância no meio de cultivo em diferentes diluições.



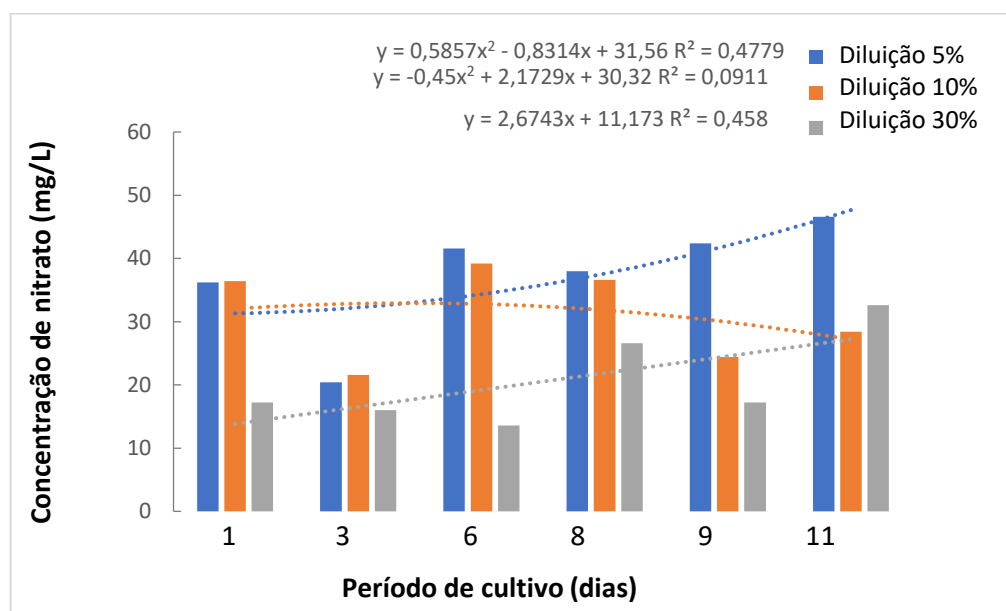
Fonte: Próprio autor.

Figura 44. Monitoramento da concentração de amônia no meio de cultivo em diferentes diluições.



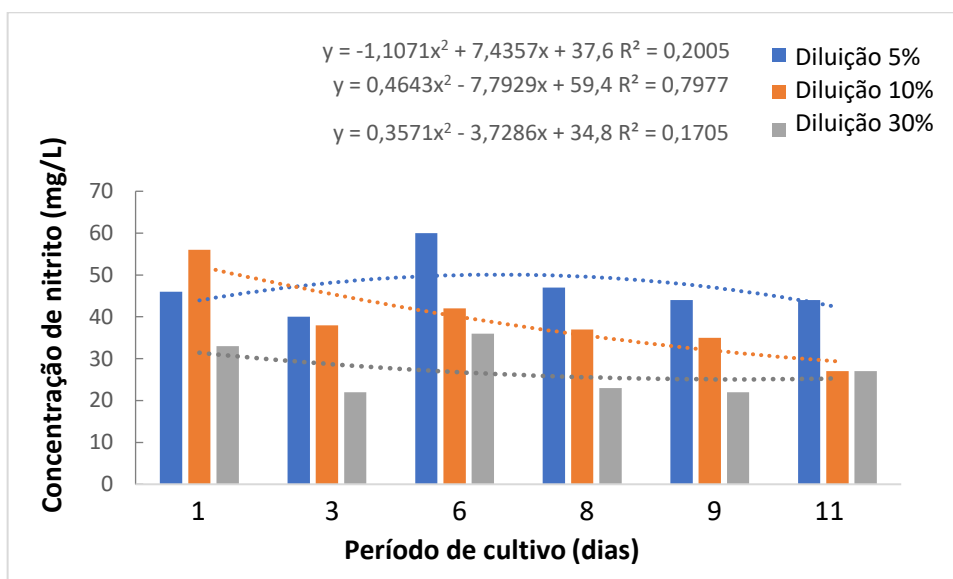
Fonte: Próprio autor.

Figura 45. Monitoramento da concentração de nitrato no meio de cultivo em diferentes diluições.



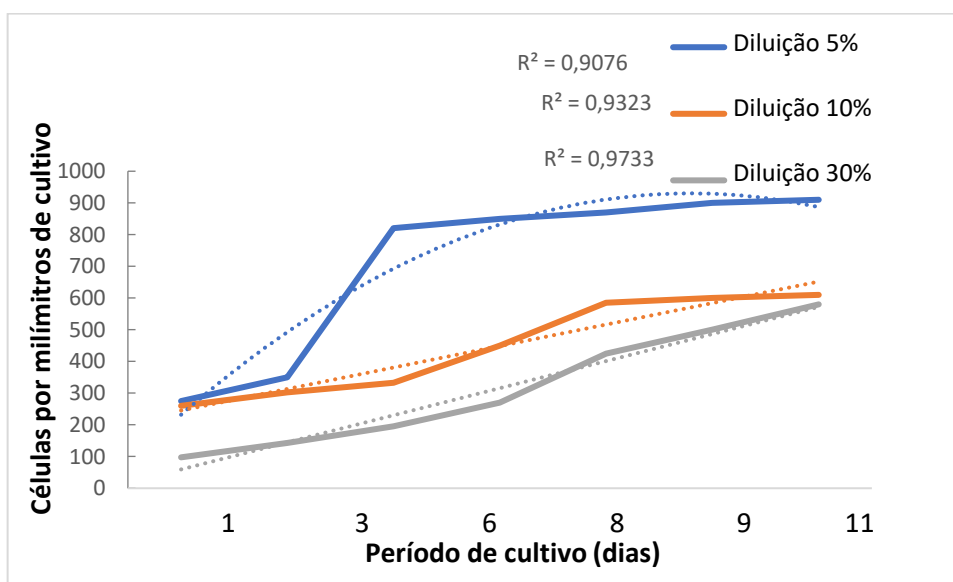
Fonte: Próprio autor.

Figura 46. Monitoramento da concentração de nitrito no meio de cultivo em diferentes diluições.



Fonte: Próprio autor.

Figura 47. Monitoramento do crescimento celular no meio de cultivo em diferentes diluições.



Fonte: Próprio autor.