



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ANA VICTÓRIA DOS SANTOS BORGES

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM BIORREATOR TIPO RACEWAY EM ÁGUA
RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SALVADOR
2024

ANA VICTÓRIA DOS SANTOS BORGES

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM BIORREATOR TIPO RACEWAY EM ÁGUA
RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia Química, da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia, em cumprimento às exigências legais para a obtenção do grau de Engenheira Química, no período 2024.1.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Carolina Oliveira de Souza

Co-Orientadora:

Me^ª. Bianca Bomfim Andrade

SALVADOR
2024

ANA VICTÓRIA DOS SANTOS BORGES

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM BIORREATOR TIPO RACEWAY EM ÁGUA
RESIDUAL DA EXTRAÇÃO DE PETRÓLEO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Engenharia Química,
da Escola Politécnica da Universidade Federal
da Bahia, em cumprimento às exigências legais
para a obtenção do grau de Engenheira
Química, no período 2024.1.

Banca Examinadora:

Carolina O. Souza

Prof. Dr^a. Carolina Oliveira de Souza
Universidade Federal da Bahia

Bianca Bomfim Andrade

Me^a. Bianca Bomfim Andrade
Universidade Federal da Bahia

Ingrid Rocha Teixeira

Prof^a. Me^a. Ingrid Rocha Teixeira
Universidade Federal da Bahia

Vivian Marina Gomes Lage

Dr^a. Vivian Marina Gomes Barbosa Lage

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer especialmente à minha família. Minha mãe, tias e primas pelo apoio, compreensão e por me ensinar que a educação tem poder transformador.

Às minhas amigas Vanessa Ribeiro, Ester Pires, Camila Sampaio, Silvana Santos e Tais Bittencourt, pelo companheirismo e incentivo fundamental na minha trajetória na graduação.

Ao meu amigo Gabriel Vasconcelos pela amizade, companheirismo e risadas. Como ele mesmo diz, “por formar uma dupla incrível”.

Aos meus amigos na residência universitária que formaram uma rede de apoio dentro e fora da universidade. Às minhas amigas Alana Rosa, Rísia Nathaly e Vívely Ribeiro que mesmo à distância encontram um jeito serem presentes.

À Família Luz Argôlo por me receber e acolher em seu lar nos primeiros anos em Salvador. Em especial Sabrine Argôlo e Luzia Luz.

À minha coorientadora Bianca Bonfim pela paciência, ensinamentos, suporte, colaboração e amizade, a qual foi essencial para conclusão desse trabalho.

À minha orientadora Carolina Souza por toda atenção e suporte durante o processo de pesquisa e elaboração do trabalho final de curso.

Ao meu orientador de pesquisa, Lucas Guimarães, pela dedicação, atenção, ensinamentos e muitos conselhos que me guiaram durante a graduação.

À equipe e aos professores do LAPESCA, Denilson Assis, Jamila Silva, Danilo Silva, Luiggi Pessôa, Natália Hlavnicka, Ingrid Rocha, Ravena Medeiros pela atenção e disponibilidade. E aos professores da Escola Politécnica pelos ensinamentos.

A todos que contribuíram para meu crescimento profissional durante o meu estágio na BASF S.A., em especial Bruno Ferreira, Hebert Silva, Leila Reis e Diego Viana.

À Pró-Reitoria de Assistência Estudantil, que através das políticas de assistência estudantil fomenta o acesso de estudantes de baixa renda à universidade pública, e garantiu minha permanência no curso.

A todos sou imensamente grata!

RESUMO

A indústria do petróleo gera grandes volumes de água residual durante a extração, conhecida como água produzida (AP), que contém diversos poluentes. É necessário um tratamento eficiente antes de seu descarte ou reutilização, e a biorremediação com microalgas é uma abordagem promissora para esse fim. Esse trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial de biorremediação e produção de biomassa de *Chlorella vulgaris* utilizando água produzida suplementada como meio de cultivo em larga escala. Para isso foi realizado o cultivo de *C. vulgaris* em 30% de água produzida e 70% de meio BG-11, que resultou em uma produção significativa de biomassa (0,628 g L⁻¹ controle e 0,601 g L⁻¹ AP30) e síntese de biomoléculas de alto valor agregado, lipídios (6,14%), proteína (24,77%), carboidratos (3,67%) e pigmentos (6,24 µg mL⁻¹ de clorofila *a*; 0,64 µg mL⁻¹ de clorofila *b* e carotenoides totais 2,83 µg mL⁻¹) para o cultivo AP30. A biomassa do cultivo AP30 apresentou composição ideal de ácidos graxos (62,78% de AGS, 12,55% de AGM e 24,69% de AGP) para a produção de biodiesel, além de contribuir para a biorremediação da água produzida, com alta eficiência na remoção de Zinco (100%); Cloreto (Cl⁻) 99,90%; Fosfato (PO₄) 98,00% e Carbonatos (CaCO₃) 80,73%. Desse modo, *C. vulgaris* mostrou ser uma alternativa promissora, não apenas para a biorremediação da água produzida, mas uma fonte potencial de biocombustíveis, promovendo uma abordagem sustentável e eficiente na gestão de resíduos industriais.

Palavras-chave: Biorremediação, bioprodutos, biocombustíveis.

ABSTRACT

The oil industry generates large volumes of wastewater during extraction, known as produced water (PW), which contains various pollutants. Efficient treatment is necessary before its disposal or reuse, and bioremediation with microalgae is a promising approach for this purpose. This study aims to evaluate the bioremediation potential and biomass production of *Chlorella vulgaris* using supplemented produced water as a large-scale cultivation medium. For this, *C. vulgaris* was cultured in 30% produced water and 70% BG-11 medium, resulting in significant biomass production (0,628 g L⁻¹ control and 0,601 g L⁻¹ PW30) and the synthesis of high-value biomolecules: lipids (6,14%), protein (24,77%), carbohydrates (3,67%), and pigments (6,24 µg mL⁻¹ of chlorophyll *a*; 0,64 µg mL⁻¹ of chlorophyll *b*, and total carotenoids 2,83 µg mL⁻¹) for the PW30 culture. The biomass of the PW30 culture presented an ideal fatty acid composition (62,78% saturated fatty acids, 12,55% monounsaturated fatty acids, and 24,69% polyunsaturated fatty acids) for biodiesel production, in addition to contributing to the bioremediation of produced water, with high removal efficiency of Zinc (100%); Chloride (Cl⁻) 99,90%; Phosphate (PO₄) 98,00% and Carbonates (CaCO₃) 80,73%. Thus, *C. vulgaris* proved to be a promising alternative not only for the bioremediation of produced water but also as a potential source of biofuels, promoting a sustainable and efficient approach to industrial waste management.

Keywords: Bioremediation, Bioproducts, Biofuels

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura esquemática de <i>C. vulgaris</i> representando diferentes organelas. Fonte: Adaptado de Safi <i>et al.</i> ,2014.	15
Figura 2 - Países (a) e origem (b) dos aplicantes das patentes relacionadas à obtenção de biopolímeros a partir de microalgas cultivadas em águas residuais.....	18
Figura 3 - Evolução anual de depósito de patentes.	19
Figura 4 – Inóculo de <i>C. vulgaris</i> utilizado nos experimentos. Fonte: autoria própria.	22
Figura 5 – Início(a) e fim (b) do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> no biorreator tipo <i>raceway</i> de 250L. À direita cultivo no meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e à esquerda cultivo controle (meio BG-11). Fonte: autoria própria.....	23
Figura 6 – Biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> liofilizada. Fonte: autoria própria.	24
Figura 7 - Produção de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).....	27
Figura 8 – pH dos cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e controle (meio BG-11).....	28
Figura 9 - Concentração de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides totais da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais componentes e suas concentrações da água produzida.	17
Tabela 2 - Produção de biopolímeros através do cultivo de microalgas em águas residuais. ...	20
Tabela 3 - Parâmetros de crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).....	28
Tabela 4 - Composição química do meio antes e após cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	29
Tabela 5 - Composição de proteínas, lipídios e carboidratos em <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).....	30
Tabela 6 - Composição de ácidos graxos em <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ρ_{etanol} – densidade do etanol

AG – ácido graxos

AGM – ácidos graxos monoinsaturados

AGP – ácidos graxos poli-insaturados

AGS – ácidos graxos saturados

AP – água produzida

AP30 – tratamentos contendo 30% de água produzida e 70% BG-11

BTEX – benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos

C. vulgaris – *Chlorella vulgaris*

C_a – Clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

C_b – Clorofila *b* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

C_{CT} – Carotenoides Totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

CE – glicose em etanol

C_f – concentração final (g L^{-1})

C_i – concentração inicial (g L^{-1})

DQO – demanda química de oxigênio

EPS – *extracellular polymeric substances* / exopolissacarídeos

ER – eficiência de remoção de nutrientes (%)

HRP – hidrocarbonetos de petróleo resolvidos

HTP – hidrocarbonetos totais de petróleo

LaBBiotec – Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia

NFD – naftaleno, fenantreno e dibenzotiofeno

PAH - hidrocarbonetos poliaromáticos

PHA – *polyhydroxyalkanoates* / polihidroxialcanoatos

PHB – *polyhydroxybutyrate* / poli-hidroxi-butilato

t – tempo em dias

TDS – Sólido dissolvido total

TOC – Carbono orgânico total

TSS - Sólido suspenso total

UFBA – Universidade Federal da Bahia

X_0 – concentração de biomassa (gL^{-1}) no tempo $t_0(\text{d})$ inicial

X_t – produção de biomassa (gL^{-1})

λ – comprimento de onda

μ_{esp} – crescimento específico (d^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	14
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
4.1	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	15
4.2	ESTADO DA ARTE	18
5	MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1	PREPARO E OBTENÇÃO DO INÓCULO	22
5.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	22
5.3	PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E pH.....	24
5.4	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES	24
5.5	COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA	25
5.6	CLOROFILA <i>a</i> , CLOROFILA <i>b</i> E CARATENOIDES TOTAIS	25
5.7	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	25
5.8	PRODUÇÃO TEÓRICA DE BIOETANOL	26
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1	PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E pH.....	27
6.2	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES	29
6.3	COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA	30
6.4	CLOROFILA <i>a</i> , CLOROFILA <i>b</i> E CARATENOIDES TOTAIS	31
6.5	COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E QUALIDADE DO BIODIESEL	33
6.6	PRODUÇÃO TEÓRICA DE BIOETANOL	34
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	APÊNDICE 1	43

1 INTRODUÇÃO

A indústria do petróleo consome altos volumes de água, gerando a água residual durante a extração, denominada água produzida (AP). Estima-se que a produção anual seja de 2,6 bilhões de m³. Este resíduo pode ser resultante de dois processos: (1) da mistura do óleo do poço com a água do mar que se encontra ao redor deste ou (2) pela injeção de água no campo de petróleo para levar o óleo profundo à superfície (César *et al.*, 2024). A AP possui alto potencial poluidor, por conter derivados de petróleo, bem como metais (bário, cobre, níquel, chumbo, cádmio, ferro e zinco), e hidrocarbonetos como os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), NPD (naftaleno, fenantreno e dibenzotiofeno), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e fenóis. Por esse motivo, é necessário um processo de tratamento eficiente antes de seu despejo ou reutilização (Lake, 2007; Al-Ghouti *et al.*, 2019).

O processo de tratamento a ser escolhido para AP depende da localização da base de produção, legislação, viabilidade técnica, custos e disponibilidade de infraestrutura e de equipamentos. A biorremediação é uma nova abordagem que tem sido introduzida para processos de tratamento de AP, permitindo uma maior taxa de remoção de poluentes. Esta técnica pode ser feita utilizando microalgas, devido à sua capacidade de utilizar compostos presentes em AP como fonte de nutrientes, por exemplo, nitrogênio total, fosfato total e demanda química de oxigênio (DQO) (Motta *et al.*, 2013; Znad *et al.*, 2018). Autores como Mata *et al.* (2020) defendem que a utilização de águas residuais não apenas diminui os custos de cultivo, mas também gera biomassa de alto valor agregado. A produção de biomoléculas de interesse comercial e de biomassa com elevado teor de carboidratos permite a geração de bioprodutos como os biocombustíveis. Dessa forma, as águas residuais se mostram uma alternativa promissora para o cultivo de microalgas, aliado a biorremediação e obtenção de biomoléculas e bioprodutos.

Alguns autores relatam que algumas espécies de microalgas, como *Nannochloropsis oculata*, *Dunalliella tertiolecta*, *Scenedesmus* sp. e *Arthrospira platensis* têm a capacidade de crescer em ambientes adversos, ricos em sal e na presença de contaminantes, produzindo biomassa e ácidos graxos (Arriada e Abreu, 2014; Al-Ghouti *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2017; Cardoso *et al.* 2021). Além da alta capacidade de adaptação, alta taxa de crescimento em condições adversas e tolerância a altos níveis de metais pesados, o gênero *Chlorella* tem sido amplamente utilizado na biorremediação de águas residuais. Diversos autores demonstram a eficiência de remoção (80-100%) de nitrogênio, fósforo e demanda química de oxigênio e

capacidade de se ligar (adsorção) a metais pesados presentes em águas residuais (Zhigang *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2017; Znad *et al.*, 2018).

Silva *et al.* (2022) indicam uma alta eficiência para a remoção de metais - como cobre (70,00%), manganês (76,89%), molibdênio (97,82%), zinco (96,55%) e ferro (90,74%) - e hidrocarbonetos (48,59%) em águas residuárias de processos industriais de extração de petróleo no cultivo com *Chlorella* sp. Jaafari e Yaghmaeian (2019) observaram maior biossorção de metais pesados pela microalga dulcícola *Chlorella coloniales* com o aumento da concentração celular, atingindo valores máximos para metais como cromo (96,3%), cádmio (97,2%), cobalto (92,9%), ferro (90,3%) e arsênio (99%). Além da biorremediação, o cultivo de microalgas em AP permite a síntese de biomoléculas de alto valor agregado, como biopolímeros, lipídios, carboidratos e proteínas, que podem ser convertidas em bioprodutos, a exemplo de biodiesel e bioplásticos de interesse industrial (Silva *et al.*, 2023).

Portanto, explorar o potencial das microalgas na remoção de contaminantes de AP e na produção simultânea de biomoléculas e bioprodutos apresenta desafios e oportunidades. Estudos futuros podem focar na identificação de espécies de microalgas eficazes, na otimização das condições de cultivo e na integração de processos para maximizar a remediação e a síntese de produtos valiosos. Desenvolver tecnologias híbridas que combinem biorremediação com outros métodos de tratamento pode melhorar a eficiência global e contribuir para soluções mais sustentáveis e inovadoras na gestão de resíduos industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de biorremediação e a produção de biomassa de *Chlorella vulgaris* utilizando água produzida suplementada como meio de cultivo em escala piloto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Escalonar em sistema *outdoor* o tratamento de AP proposto por Silva *et al.* (2023) em um biorreator tipo *raceway* de 250L;
- Avaliar a viabilidade do cultivo de *C.vulgaris* em escala piloto com substrato composto de 30% de AP e 70% de meio sintético BG11;
- Analisar a composição físico-química da AP suplementada antes e após o cultivo de *C. vulgaris*;
- Caracterizar a composição bioquímica da biomassa produzida de *C. vulgaris*;
- Determinar o perfil de ácidos graxos da biomassa.

3 ESTRUTURA DO TRABALHO

O trabalho foi dividido em 7 capítulos. No capítulo 1 foi feita a introdução e contextualização do tema a ser abordado. No capítulo 2 foram apresentados os objetivos gerais e específicos do trabalho. No capítulo 4 será abordada a fundamentação teórica, trazendo os conceitos básicos e o estado da arte através do artigo de prospecção tecnológica. No capítulo 5 serão apresentados os métodos utilizados para avaliação do experimento e quantificação/qualificação dos resultados. No capítulo 6 estarão apresentados os resultados e as discussões pertinentes. Por último, o capítulo 7, a conclusão do estudo, com o fechamento do trabalho e objetivos alcançados. No Apêndice 1 são listados trabalhos publicados que foram originados do trabalho final de curso.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Chlorella vulgaris é uma microalga unicelular de cor verde, esférica, pertencente ao filo Chlorophyta, do domínio Eukaryota, classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales e família Chlorellaceae. O nome "*Chlorella*" deriva da palavra grega "chloros", que significa verde, e o sufixo "ella" do latim, indicando seu tamanho microscópico (Safi *et al.*, 2014).

As células jovens de *Chlorella vulgaris* têm um tamanho de 2-10 µm, podendo alcançar 17-21 µm na fase adulta, com uma parede celular rígida composta por glucosamina, celulose, hemicelulose e glicanos do tipo quitina. Seu citoplasma contém várias organelas, sendo rico em água, proteínas solúveis e minerais. A composição da biomassa pode variar conforme a espécie e o meio de cultivo, mas geralmente é composta por proteínas (42 a 58%), lipídios (5 a 40%), carboidratos (12 a 17%) e pigmentos (Bruvana *et al.*, 2019; Safi *et al.*, 2014).

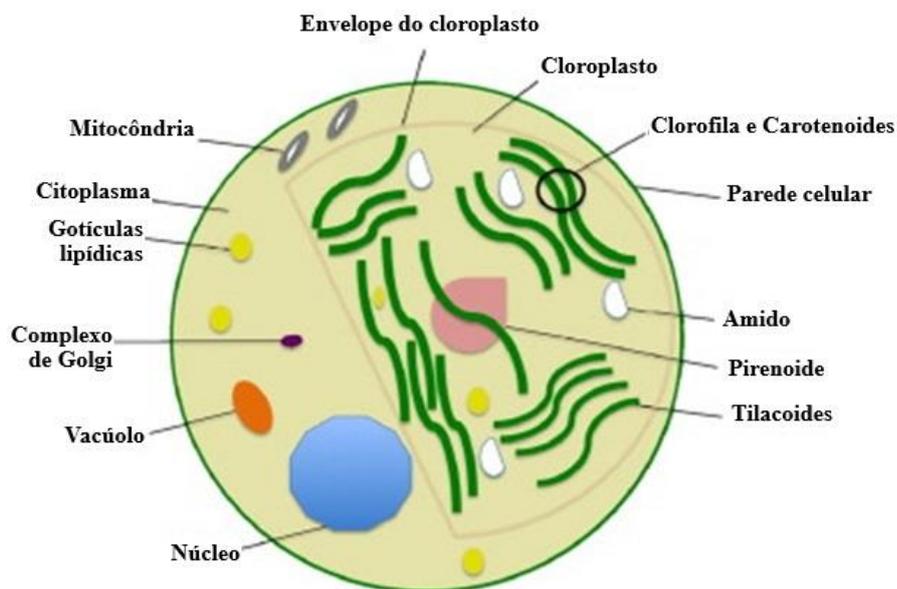


Figura 1 - Estrutura esquemática de *C. vulgaris* representando diferentes organelas. Fonte: Adaptado de Safi *et al.*, 2014.

A célula reprodutiva de *C. vulgaris* não apresenta motilidade (autósporos), com reprodução assexuada e rápida em 24 horas. É cultivada principalmente em sistemas abertos, como lagoas, ou sistemas fechados, como fotobiorreatores, biorreatores/fermentadores. As lagoas abertas são a forma mais comum de produção e são o método mais barato para a produção de biomassa em larga escala. O cultivo em fotobiorreatores foi implementado principalmente para superar as limitações dos sistemas abertos, aumentando assim a biomassa em um ambiente controlado (pH, intensidade de luz, temperatura, concentração de dióxido de carbono) para obter maior concentração celular (Bruvana *et al.*, 2019).

O cultivo de microalgas pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. No cultivo autotrófico, as microalgas utilizam exclusivamente a luz solar ou artificial e o carbono inorgânico para gerar energia. Esse método é caracterizado por demandar menor investimento e apresentar custos operacionais reduzidos. No entanto, suas desvantagens incluem a dependência das condições climáticas e a necessidade de precauções contra a contaminação por outros microrganismos. No cultivo heterotrófico as células são cultivadas em biorreatores com fontes de carbono orgânico, como glicose, acetato, glicerol e glutamato. Isso permite um crescimento elevado e baixo custo de colheita devido à alta produtividade de biomassa seca e lipídios. A desvantagem principal é o custo e a disponibilidade de açúcares, que competem com outros usos, como alimentos e biocombustíveis. No cultivo mixotrófico, as microalgas podem realizar fotossíntese e utilizar materiais orgânicos, como glicose. Esta técnica combina os benefícios dos métodos autotróficos e heterotróficos, resultando em alta produtividade de biomassa e lipídios, e reduz o impacto da perda de biomassa e o uso de substratos orgânicos. (Coronado-Reyes *et al.*, 2022)

Devido ao seu valor nutricional a produção de *C. vulgaris* é principalmente destinada ao consumo como suplemento alimentar. Espécies de *Chlorella* sp. são usadas para produzir biopolímeros e bioplásticos, incluindo plásticos híbridos, à base de celulose, ácido polilático e bio-polietileno. A matriz polimérica extracelular das microalgas é promissora para as indústrias farmacêutica, bioplástica e alimentícia. A produção de plásticos biodegradáveis a partir de fontes naturais, como PHAs, poli-lactídeos, poliésteres alifáticos, polissacarídeos e copolímeros, está em expansão, mas ainda há necessidade de pesquisas para viabilizar a produção em larga escala. No entanto, há necessidade de pesquisas destinadas a operações em escala industrial, visando extrair polissacarídeos e biopolímeros de microalgas, com foco em facilitar as aplicações na indústria (Safi *et al.*, 2014; Khanra *et al.*, 2018;).

A AP é um subproduto significativo da extração de petróleo e gás, com volumes que podem exceder o volume de petróleo extraído em muitos casos, estimasse que a proporção de AP seja em média superior a 3:1 (César *et al.*, 2014; Lake, 2007). AP é composta por água da formação, água injetada e contaminantes que podem incluir sais, produtos químicos e partículas de petróleo (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais componentes e suas concentrações da água produzida.

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

Fonte: Al-Ghouti *et al.* (2019).

A gestão da AP é crucial para a operação eficiente dos campos de petróleo e para a minimização dos impactos ambientais. O tratamento da água produzida pode envolver processos de separação física, tratamento químico e métodos de filtração para remover contaminantes e possibilitar o reuso ou descarte seguro (Lake, 2007; Al-Ghouti *et al.*, 2019).

Diversas espécies de microalgas têm demonstrado eficácia no tratamento de águas residuais, como a AP, incluindo *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* e *Scenedesmus obliquus*, em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (Zhai *et al.*, 2017). O uso de AP para o cultivo de microalgas é uma alternativa de redução do custo com água fresca e para o reuso de AP. Os compostos presentes na AP podem ser tóxicos para as microalgas, como componentes orgânicos, derivados de hidrocarbonetos, aditivos químicos (surfactantes, metanol, biocidas, cloreto de potássio) e metais traços (Graham *et al.*, 2017). No entanto, algumas espécies de microalgas, como a *Synechocystis* sp. PCC6803 e *Nannochloropsis salina*,

conseguem se desenvolver em altos níveis de hidrocarbonetos, salinidade e na presença de metais pesados com produtividade de até $150,9 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Ammar *et al.*, 2018).

4.2 ESTADO DA ARTE

Com o objetivo de fornecer uma compreensão do tema, foi realizado um levantamento de documentos de patentes e artigos científicos sobre o progresso atual na obtenção de biopolímeros a partir de microalgas cultivadas em águas residuais. Levantando pontos críticos, panorama atual do mercado, tendências e perspectivas para a implementação da biorrefinaria integrada de microalgas. O artigo “*Biopolymers Synthesized by Microalgae Grown in Wastewater: a Technological Survey*” está publicado com os resultados completos na revista *BioEnergy Research*, volume 17, páginas 73-86 (Borges *et al.*, 2024).

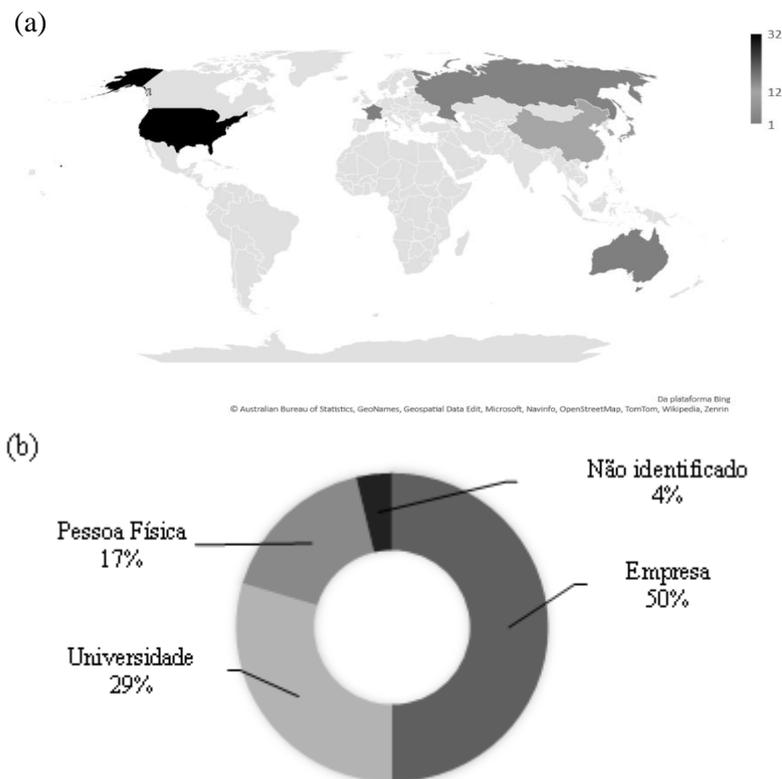


Figura 2 - Países (a) e origem (b) dos aplicantes das patentes relacionadas à obtenção de biopolímeros a partir de microalgas cultivadas em águas residuais.

Os EUA são o país com maior número de patentes (32), seguidos pela República da Coreia (12). As empresas são os maiores depositantes, 50% (Figura 2). Sabe-se que pesquisas envolvendo o estudo de microalgas são de grande interesse mundial, com evidências para os EUA, considerados pioneiros em pesquisas com microalgas (Murata *et al.*, 2021). Os países

asiáticos também estão em evidência, gerando e incentivando inovações que desencadeiam processos de qualificação e aumentam o grau de competitividade das empresas e de suas respectivas economias, com a participação das universidades nesse processo (Tolliver *et al.*, 2020).

Os estudos sobre biotecnologia de microalgas não são recentes, datando da década de 1980 (Figura 3), e apresentaram uma visão geral dos diferentes aspectos e promessas da pesquisa com microalgas, como fatores importantes no cultivo, composição bioquímica das microalgas, seu valor nutricional, extração de biomassa e produção de química fina (Acioli e Calijuri, 2017).

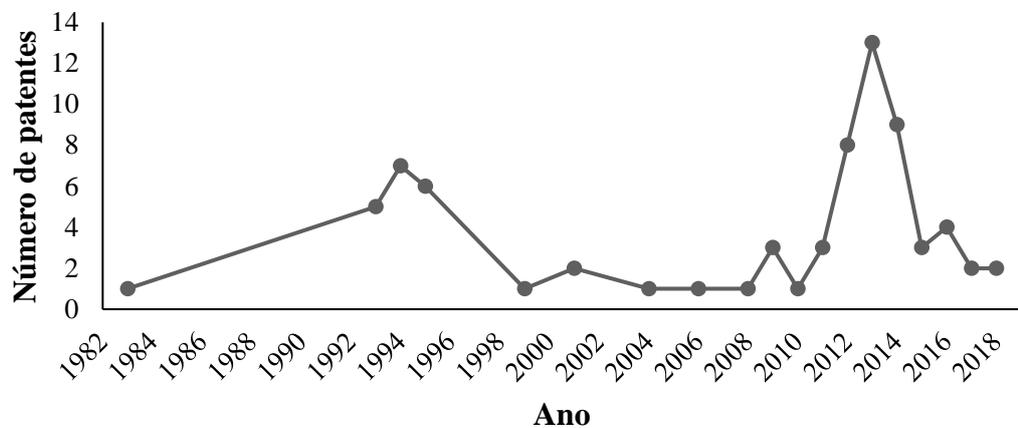


Figura 3 - Evolução anual de depósito de patentes.

A utilização de microalgas para tratamento de efluentes é atualmente foco de investigações científicas e tecnológicas, visando aumentar sua eficiência para produção em larga escala. Artigos científicos mostram que pouco tem sido pesquisado sobre a extração de biopolímeros de microalgas cultivadas em águas residuais, principalmente *polyhydroxybutyrate* (PHB) (Tabela 2). Poucas espécies são utilizadas para obtenção de biopolímeros, indicando um campo de pesquisa biotecnológica com potencial de exploração que pode gerar importantes bioprodutos e bioprocessos, possibilitando a rentabilidade de biopolímeros por microalgas.

Tabela 2 - Produção de biopolímeros através do cultivo de microalgas em águas residuais.

Microalga / Cianobactéria	Polímero	Água residual	Referência
<i>Scenedesmus obliquus</i>	EPS	Água poluída por cádmio	Ma <i>et al.</i> , 2021
Não especificado	EPS	Água residual doméstica artificial	Tang <i>et al.</i> , 2021
<i>Tetraselmis</i> sp.	EPS	Sedimentos estuarinos contaminados	Yang <i>et al.</i> , 2021
<i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	PHB	Água residual de laticínios	Kumar <i>et al.</i> , 2020
<i>Chlorella vulgaris</i>	EPS	Águas residuais de frutos do mar	Nguyen <i>et al.</i> , 2020
<i>Chlorella</i> sp.	EPS	Água residual artificial	Vo <i>et al.</i> , 2020
Consórcio microalga-bactéria não especificado	EPS	Água residual municipal sintética	Wang <i>et al.</i> , 2020
<i>Chlamydomonas</i> sp.	EPS	Água residual municipal sintética modificada	Xie <i>et al.</i> , 2020
Microalgas mistas, majoritariamente <i>Scenedesmus</i> sp.	EPS	Água residual municipal	Arcila <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella</i> sp. e <i>Micractinium</i> sp.	EPS	Efluente primário e água residual de alta resistência	Wang <i>et al.</i> , 2014

Destaca-se a capacidade das microalgas atuarem na biorremediação de efluentes, bem como na produção de bioprodutos de interesse industrial. Porém, existe uma lacuna quanto à viabilidade econômica de implementação dos métodos atuais para obtenção de biopolímeros, devido ao alto custo de produção. O custo de mercado dos PHAs varia entre 2,4 e 5,5 dólares americanos por kg, o que é mais alto do que o custo dos plásticos à base de petróleo, que é de 1,2 dólares americanos por kg de plástico sintético (Price *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023).

Mais pesquisas devem ser realizadas, buscando avaliar o cenário técnico-econômico (atualmente focado no PHB) e bioprospectar novas cepas para implementar o conceito de biorrefinaria integrada. Estas são estratégias que poderão aumentar a rentabilidade deste setor,

e permitir a utilização de microalgas para obtenção de biopolímeros a partir de efluentes é considerada um fator chave para promover uma mudança industrial (Borges *et al.*, 2024). Devem ser realizadas pesquisas avaliando o cenário técnico e econômico da biorrefinaria integrada e da bioprospecção de espécies, são estratégias que podem aumentar a rentabilidade e gerar lucro, atualmente inviáveis.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PREPARO E OBTENÇÃO DO INÓCULO

A cepa de *Chlorella vulgaris* foi obtida no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, número de depósito no herbário: 137408. Para obtenção do inóculo utilizado nos experimentos, a cepa de *C. vulgaris* foi cultivada em reatores com volume de trabalho de 20 litros, Figura 4, a 25 °C com fotoperíodo claro/escuro de 12 horas em meio sintético BG-11 (NaHCO₃; NaNO₃; K₂PO₄.3H₂O; MgSO₄.7H₂O; CaCl₂.2H₂O; C₆H₈O₇xFe₃ + NH₃; EDTA; Na₂CO₃; C₆H₈O₇ + H₂O e solução de metais traço H₃BO₃, MnCl₂ + 4H₂O; ZnSO₄ + 7H₂O; NaMoO₄, CuSO₄ + 5H₂O) (Rippka *et al.*, 1979). Ar foi fornecido às culturas através de bombas de ar (50 L h⁻¹), acoplados com filtros de fibra de vidro para evitar contaminação e lâmpadas fluorescentes tubulares foram utilizadas como fonte de energia. Após 15 dias de cultivo, o inóculo foi centrifugado (Eppendorf 5702 R) a 10.000 rpm por 5 minutos para obtenção da biomassa.



Figura 4 – Inóculo de *C. vulgaris* utilizado nos experimentos. Fonte: autoria própria.

5.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os experimentos, Figura 5, foram realizados em biorreatores do tipo *raceway* com volume de trabalho de 250 L, e concentração inicial de 0,040 g L⁻¹ por 22 dias, na primavera de 2022, entre os dias 05 à 27 de outubro. Os tratamentos consistiram em uma cultura controle (meio sintético BG-11) e tratamento contendo 30% AP + 70% BG-11 (AP30).

A partir do artigo “*Luminosity and Chemical Stress Improve the Production of Biomass and Biomolecules from Chlorella vulgaris Cultivated in Produced Water*” publicado por Silva *et al.* (2023), membros do grupo de pesquisa no qual faço parte, foi definido a proporção para o cultivo *outdoor* no biorreator tipo *raceway*. O estudo teve como objetivo estimular a produção de biomassa e biomoléculas a partir do cultivo de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores tipo Erlenmeyer (1L) por meio da suplementação com AP em diferentes concentrações (30, 40 e 50%). Segundo os autores o cultivo contendo 30% de AP foi o mais viável, com maior produção de biomassa $1,35 \text{ gL}^{-1}$.

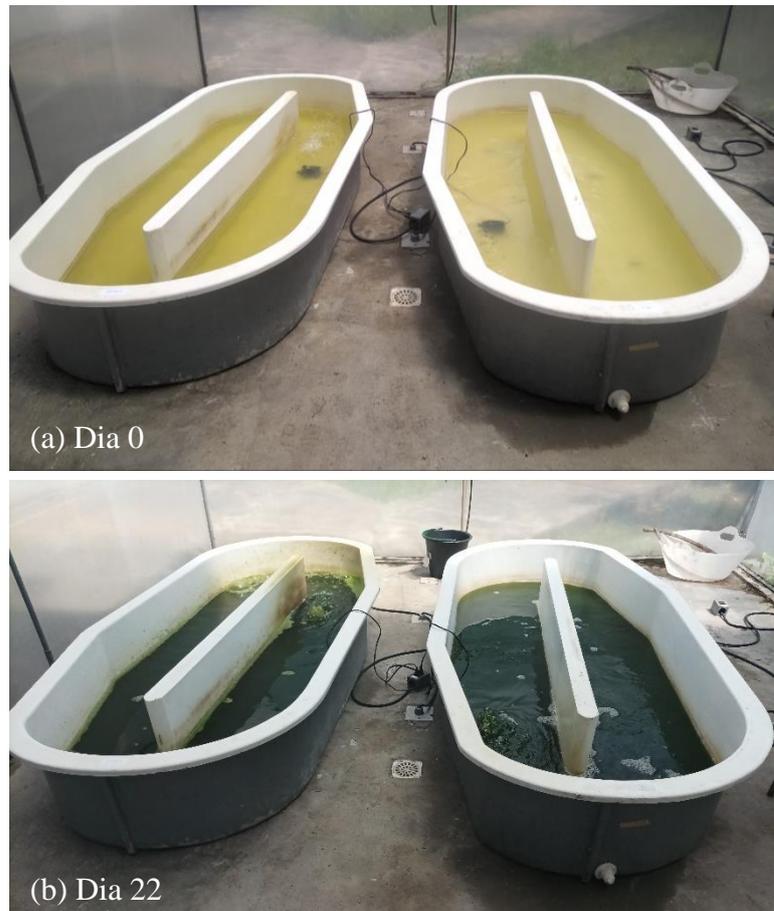


Figura 5 – Início(a) e fim (b) do cultivo de *Chlorella vulgaris* no biorreator tipo *raceway* de 250L. À direita cultivo no meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e à esquerda cultivo controle (meio BG-11). Fonte: autoria própria.

Após 22 dias de cultivo, a biomassa foi recuperada por centrifugação (Eppendorf 5702 R) a 10.000 rpm por 5 minutos, lavada com água destilada e centrifugada novamente sob as mesmas condições para remoção de sais e interferentes. Após a lavagem, a biomassa foi congelada ($-45 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e liofilizada ($-36 \text{ }^{\circ}\text{C}$, L101 - Liobras) para análises posteriores, Figura 6.



Figura 6 – Biomassa de *Chlorella vulgaris* liofilizada. Fonte: autoria própria.

5.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E pH

A concentração da biomassa de *C. vulgaris* foi determinada a cada dia, a partir da densidade óptica das culturas em espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS) no comprimento de onda (λ) 680nm. Uma curva padrão foi construída antes dos experimentos, relacionando a densidade óptica do inóculo com sua massa seca (Costa *et al.*, 2002). Parâmetros de crescimento foram determinados para cada dia de cultivo. A produtividade foi obtida pela Equação 1.

$$P_x = (X_t - X_0)/(t - t_0) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, X_t é a produção de biomassa (g L^{-1}), t (d) tempo e X_0 a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t_0 (d) inicial.

A taxa de crescimento específico (μ_{esp}) foi obtida a partir da regressão linear na fase log de cultivo. O pH foi medido diariamente usando um medidor de pH digital (Gehaka PG2000).

5.4 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES

O Cloreto (Cl^-) foi determinado pela EPA 300 (EPA, 1993), Fosfato (PO_4^{3-}) pela SMWW (Chumbo (Pb), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Níquel (Ni), Manganês (Mn), Vanádio (V), Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Cromo (Cr) pela EPA 6020 A, e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos de petróleo resolvidos (HRP) pela EPA. A eficiência de remoção de nutrientes (ER) do tratamento foi avaliada por meio da Equação 2, relatada anteriormente por Cardoso *et al.* 2020.

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = (C_i - C_f) / C_f \times 1000 \quad (\text{Equação 2})$$

No qual, C_i e C_f são, respectivamente, concentração inicial e final.

5.5 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC,2005) com fator de conversão de 5,22 para microalgas (Andrade *et al.*, 2019). Os lipídios totais foram extraídos e quantificados por Folch *et al.*(1957) com solução de clorofórmio-metanol (2:1). Os carboidratos foram determinados pelo Método Fenol-Sulfúrico (Dubois, 1956). Uma curva padrão de glicose a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ foi utilizada.

5.6 CLOROFILA *a*, CLOROFILA *b* E CARATENOIDES TOTAIS

A análise do conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais seguiu Andrade *et al.* (2019). Foram adicionados 0,2 g de amostra liofilizada a 25 mL de solução acetona:água 80:20, agitados em vórtex (Phoenix AP 56) e centrifugados (Eppendorf 5702R) a 4400rpm por 5 minutos e temperatura 23°C. O sobrenadante foi centrifugado novamente e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Perkin – Elmer Lambda 35 UV-Vis) nos comprimentos de onda 663, 647 e 470 nm. Os rendimentos foram calculados seguindo as Equações 3, 4 e 5 propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001) expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

$$C_a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647} \quad (\text{Equação 3})$$

$$C_b = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{663} \quad (\text{Equação 4})$$

$$C_{CT} = [1000 A_{470} - (1,82C_a - 85,02C_b)]/198 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde, C_a = Clorofila *a*; C_b = Clorofila *b*; C_{CT} = Carotenoides Totais.

5.7 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A composição de ácidos graxos (AG) foi determinada pela transmetilação da gordura com trifluoreto de boro em hexano, seguida de cromatografia gasosa. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados com uma coluna (DB-FFAP 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) em um cromatógrafo gasoso equipado com um detector de ionização de chama (CG-FID Clarus 680; Perkin-Elmer). As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C e 280

°C, respectivamente. A programação da temperatura iniciou em 60 °C por 0,5 minutos, aumentando para 194 °C a 25 °C min⁻¹, mantida por 1 minuto, seguida de novo aumento para 235 °C a 5 °C min⁻¹, e mantida por 1 minuto. As injeções foram realizadas no volume de 1 µL, em modo split (1:50), em triplicata. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados comparando os tempos de retenção obtidos no cromatograma padrão (C4 – C24, 189-19-AMP, Sigma-Aldrich). Segundo método proposto por Souza *et al.* (2017), as áreas dos picos foram determinadas utilizando o software *Clarus Chromatography* para normalizar a porcentagem de áreas de ácidos graxos totais.

5.8 PRODUÇÃO TEÓRICA DE BIOETANOL

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

$$\text{Etanol teórico (L)} = \text{kg} \times \text{CE} \times (\text{Carboidratos (\%)} / \rho_{\text{etanol}}) \text{ (Equação 6)}$$

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados usando o software *Statistica 10.0*. A normalidade dos resultados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste T de *Student* para dados que apresentaram distribuição normal e o teste de *Mann-Whitney* para aqueles que não apresentaram distribuição normal, a fim de verificar a significância estatística. Os resultados experimentais são apresentados como média ± desvio padrão, calculados a partir de triplicatas. Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística entre os resultados ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os resultados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E pH

A curva de crescimento do cultivo de *C. vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e o cultivo controle no biorreator tipo *raceway* é apresentada na Figura 7. Ambos os cultivos tiveram tempo de adaptação de 5 dias (dia 0–5), seguido de crescimento exponencial até o 15º dia de cultivo. Esse estudo mostrou que o tempo de adaptação em cultivo *outdoor*, no biorreator *raceway*, foi maior em 2 dias que o cultivo *indoor*, realizado por Silva *et al.* (2023), que está associado a ausência de controle das condições de cultivo, como temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa. Além disto, o tempo para iniciar o crescimento ou fase exponencial, ou seja, fase de adaptação, indica a capacidade das microalgas de se adaptarem às condições ambientais impostas (Cardoso *et al.*, 2020).

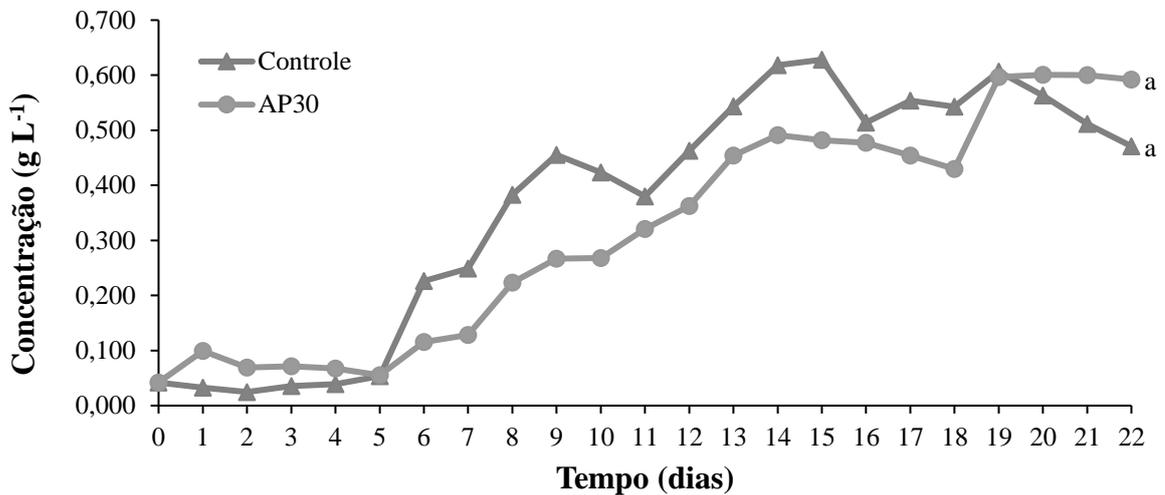


Figura 7 - Produção de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).

A Tabela 3 apresenta os parâmetros de crescimento do cultivo controle e do AP30. O cultivo controle apresentou crescimento específico (μ_{esp}) de $0,050 \text{ d}^{-1}$, estatisticamente igual ao cultivo AP30, $0,045 \text{ d}^{-1}$. A produção final do cultivo AP30 e controle foram estatisticamente iguais, respectivamente $0,592 \text{ g L}^{-1}$ e $0,471 \text{ g L}^{-1}$, assim como a produção máxima, de respectivamente $0,628 \text{ g L}^{-1}$ e $0,601 \text{ g L}^{-1}$. Este resultado mostra a capacidade de adaptação da *C. vulgaris* as condições extremas, como salinidade, temperatura, contaminantes e deficiências nutricionais. Ammar *et al.* (2018) reportam crescimento de *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* em até 50 % de água produzida, o que mostra a adaptação efetiva das cepas de microalgas o que possibilita maior produção de biomassa.

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).

	Produção final (g L ⁻¹)	Produção máxima (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ d ⁻¹)	μ _{esp} (d ⁻¹)
Controle	0,471 ± 0,003 ^a	0,628 ± 0,001 ^a	0,393 ± 0,305 ^a	0,050
AP30	0,592 ± 0,001 ^a	0,601 ± 0,003 ^a	0,057 ± 0,001 ^b	0,045

O cultivo controle teve maior produtividade que AP30, respectivamente 0,393 g L⁻¹ e 0,057 g L⁻¹. A composição ideal que o meio padrão BG-11 oferece para o crescimento celular justificam a maior produtividade do cultivo controle. Silva *et al.* (2023) e Ammar *et al.* (2018) também observaram resultado semelhante ao cultivar *C. vulgaris* no meio livre de contaminantes como metais, compostos orgânicos e nutrientes. Esses contaminantes causam interações entre componentes tóxicos e organelas intracelulares das microalgas, comprometendo suas funções biológicas normais, incluindo o crescimento (Ammar *et al.*, 2018). De acordo Silva *et al.*, (2023), o crescimento exponencial observado tanto no tratamento AP30 quanto no controle indica um sinergismo positivo entre a luminosidade e a composição química da cultura, promovendo assim o crescimento celular e o desenvolvimento exponencial da *C. vulgaris*.

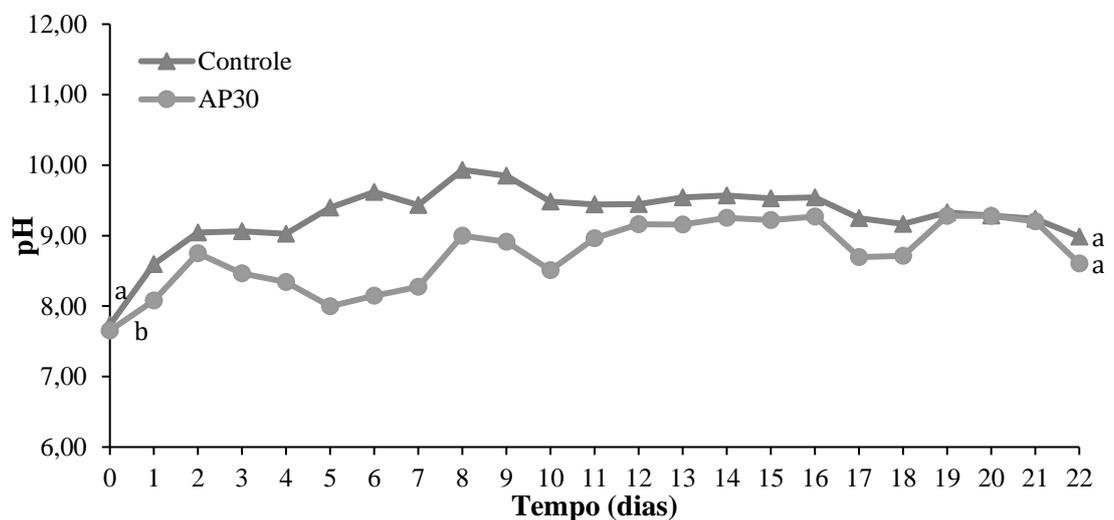


Figura 8 – pH dos cultivos de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e controle (meio BG-11).

A curva de acompanhamento do pH do cultivo AP30 e controle é apresentada na Figura 8, onde o cultivo AP30 apresentou pH inicial 7,73 e final 8,99 e controle com pH inicial 7,65 e final 8,60. Ambos os cultivos apresentaram um aumento nos primeiros dias de experimento (controle: dias 0-6 e AP30: dias 0-2), seguida de estabilização do pH após esse período. Silva *et al.* (2023) relatam que cultivos com pH superior a 8,00 apresentam melhor

crescimento e produção de biomassa, pois a faixa de pH entre 8,00 e 10,00 é ideal para o cultivo de *Chlorella* suplementada com 30% de AP, mesma faixa de pH foi obtida nos experimentos deste estudo

6.2 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES

A água produzida (AP) possui pequenas quantidades de nitrogênio (N) e fósforo (P), Tabela 1. No entanto, possui outros elementos que também são necessários para crescimento de microalgas em determinadas concentrações, pois fazem parte do funcionamento dos processos fisiológicos e metabólicos das microalgas. Elementos esses tais como cobre (Cu), manganês (Mn), molibdênio (Mo), zinco (Zn) e ferro (Fe) fazem parte do metabolismo de algumas espécies de microalgas, incluindo a *Chlorella* utilizada no presente estudo (Al-Ghouti *et al.*, 2019).

Tabela 4 - Composição química do meio antes e após cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Componente	LQ*	Antes do tratamento (mg L ⁻¹)	Após o tratamento (mg L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)
Nitrogênio Nitrato (NO ₃)	0,25	461,55	458,91	0,57
Cloreto (Cl ⁻)	0,30	11.770,60	12,253	99,90
Alcalinidade de Carbonatos (CaCO ₃)	2,00	273,31	52,67	80,73
Fosfato (PO ₄)	0,25	15,00	0,30	98,00
Salinidade (ppt) ‰	0,01	25,15	21,88	13,00
Cadmio (Cd)	0,50	<0,50	<0,50	-
Chumbo (Pb)	0,50	<0,50	<0,50	-
Níquel (Ni)	0,50	<0,50	<0,50	-
Cobalto (Co)	0,50	<0,50	<0,50	-
Cromo (Cr)	0,50	<0,50	<0,50	-
Cobre (Cu)	0,50	<0,50	<0,50	-
Zinco (Zn)	0,50	0,61	<0,50	100,00
Ferro (Fe)	1,00	<1,00	<1,00	-
Arsênico (As)	1,00	<1,00	<1,00	-
Magnésio (Mg)	0,10	<0,10	<0,10	-
Molibdênio (Mo)	1,00	<1,00	<1,00	-
Vanádio (V)	1,00	<1,00	<1,00	-

* LQ = Limite de quantificação.

Para os parâmetros de alcalinidade de carbonatos (CaCO₃) e fosfato foi observada uma alta eficiência de remoção (99,90% e 80,73%, respectivamente) e remoção total de zinco (Zn), além de redução de salinidade (13,00%) e nitrogênio nitrato (0,57%). O carbonato de sódio (CaCO₃), em concentrações específicas, é essencial para metabolismos e crescimento de

diversos microrganismos, incluindo microalgas, o que explica sua alta eficácia na remoção. (Ansilago *et al.*, 2016)

Silva *et al.* (2023) encontraram uma eficiência de remoção de ferro (Fe) de 61,80%, assim como remoção de 16,45% do manganês presente na AP, ambos elementos essenciais no metabolismo das microalgas. Nesse estudo os componentes com maior eficiência de remoção foram fosfatos (97,18%) e cloretos (79,64%). Os autores atribuem a alta eficiência de remoção de Cl^- à capacidade das microalgas de remover íons cloro e produzir lipídios e polióis como uma resposta osmorregulatória à concentração de soluto extracelular, minimizando o estresse osmótico e a desidratação.

A remoção de fosfatos (PO_4^-) no tratamento é relacionada à absorção de fósforo (P) para o crescimento de microalgas, pois estas acumulam fósforo em suas células como polifosfatos e o utilizam para sintetizar constituintes celulares, como fosfolipídios e ácido nucléico, e para reações relacionadas à divisão celular (Brar *et al.*, 2018). A remoção de nitrato ocorre devido ao mecanismo geral que as microalgas possuem de usar NO_3^- através das enzimas nitrato e nitrito redutase para o crescimento celular (Milhazes-Cunha e Otero, 2017). Esse resultado também foi obtido por Cardoso *et al.* (2020), que encontrou alta remoção do nitrato em cultivo de *Arthrospira platensis* em escala piloto ao ar livre utilizando água residual da aquicultura.

6.3 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA

A Tabela 5 apresenta os resultados de composição bioquímica da biomassa de *C. vulgaris* obtida do cultivo AP30 e controle. A concentração de lipídios no tratamento AP30 e controle, foram inferiores às observadas por Silva *et al.* (2023) após cultivo *indoor* de *C. vulgaris* em água produzida (9,92%).

Tabela 5 - Composição de proteínas, lipídios e carboidratos em *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).

	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)
Controle	37,52 ± 1,77 ^a	6,74 ± 0,47 ^a	18,67 ± 1,31 ^a
AP30	24,77 ± 1,26 ^b	6,14 ± 2,13 ^a	3,67 ± 0,43 ^b

Este resultado pode estar relacionado à alta salinidade da AP utilizada no presente estudo (Tabela 3), e ao estresse metálico forçando a degradação de macromoléculas para

manutenção do metabolismo (Church *et al.*, 2017). De acordo com Silva *et al.* (2023) a alta salinidade pode ter efeito negativo na produção de lipídios, uma vez que estes estejam acima do limite tolerado por *C. vulgaris*, o que causa redução nos lipídios da biomassa. O cultivo de *Oscillatoria* sp. em águas residuais da agroindústria realizado por Jawaharraj *et al.* (2016) também apresentam uma baixa concentração de lipídios em (9,60%).

O teor de proteínas totais no tratamento AP30 (24,44%) foi inferior ao cultivo controle (37,52%). Resultado semelhante ao encontrado por Silva *et al.* (2023), 21,94% em condição similar de cultivo, 30% de água produzida. Lawton *et al.*, 2015 associam esse baixo teor de proteína encontrado na biomassa cultivada em água produzida ao estresse salino, visto que sob altas salinidades, as células desviam a energia disponível para a osmorregulação, em vez de usá-la na síntese de proteínas. Resultado também obtido por Mata *et al.* (2020), no qual o teor de proteína foi de 32,15% na biomassa de *Arthrospira platensis* cultivada em água residual suplementadas com 25% de meio padrão de cultivo.

O cultivo AP30 e controle de *C. vulgaris* apresentaram uma produção de carboidratos inferiores aos obtidos por Silva *et al.* (2023) (Tabela 5). No entanto, a iluminação constante dos cultivos *indoor*, como foi utilizado pelos autores, pode proporcionar a formação de amido e açúcares pela via de redução da pentose de fosfato, favorecendo a síntese desta biomolécula. No cultivo *outdoor*, pela utilização de um biorreator *raceway*, não há iluminação constante, o que pode justificar a baixa produção de carboidratos. Essa diminuição substancial na quantidade de carboidratos encontrada na biomassa do cultivo AP30 também foi reportada por Lawton *et al.*, 2015 que em seu estudo aponta uma significativa redução no teor de carboidratos (>80%) no cultivo de *Oedogonium* em meio salino.

6.4 CLOROFILA *a*, CLOROFILA *b* E CARATENOIDES TOTAIS

A Figura 9 apresenta os dados de concentração dos pigmentos clorofila *a*, *b* e carotenoides totais. O tratamento AP30 apresentou 6,24 e 0,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila *a* e *b*, respectivamente, para o controle esses valores foram 8,71 e 1,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (clorofila *a* e *b*). A redução da concentração destes pigmentos pode ser resultado das condições de estresse impostas à microalga no tratamento AP, causadas pela presença de hidrocarbonetos, metais e excesso de matéria inorgânica (Ammar *et al.*, 2018). O teor de clorofila também está relacionado à concentração de biomassa e à penetração da luz. Diferentemente dos resultados

obtidos, Silva *et al.* (2023) observaram aumento na concentração de clorofila *a* e *b* após cultivo em 30% de AP (controle: 6,64 e AP: 10,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

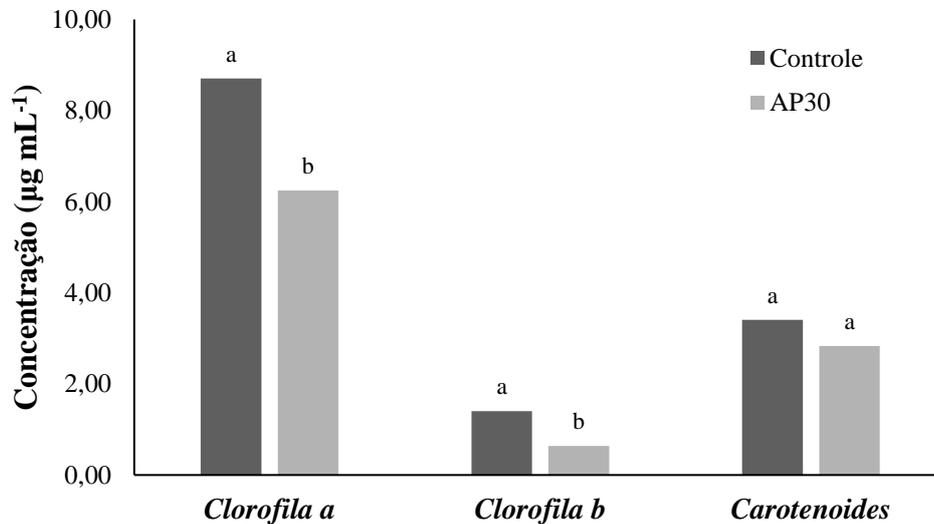


Figura 9 - Concentração de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).

A utilização de AP não impactou negativamente a produção de carotenoides totais uma vez que não houve diferença estatística entre os valores. Os baixos teores de carotenoides na biomassa do cultivo AP30 (2,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e controle (3,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparados ao cultivo *indoor* realizado por Silva *et al.*, (2023) (controle: 6,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e AP: 10,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$), podem ter sido influenciados pela exposição dos cultivos à luz, onde ficaram expostos aos regimes de incidência solar. Visto que, a incidência luminosa desencadeia uma resposta antioxidante para inibir a formação de peróxidos e oxigênio reativo. Como os carotenoides estão presentes na membrana do cloroplasto, eles têm a função de proteger os sistemas fotossintéticos contra o estresse causado pela iluminação (Yusof *et al.*, 2021). Com uma incidência solar do sistema *outdoor* maior que 12 horas, era esperado que o maior tempo de exposição resultasse em maiores concentrações de carotenoides, no entanto, as menores produções de clorofila *a* e *b* impactaram em teores de carotenoides menores (AP30 2,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e controle 3,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparado ao encontrado por Silva *et al.* (2023), de 21,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E QUALIDADE DO BIODIESEL

A composição de ácidos graxos no cultivo AP30 e controle, são apresentados na Tabela 6. No cultivo AP30 foi encontrado 62,78% de ácidos graxos saturados (AGS), 12,55% de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e 24,69% de ácidos graxos poli-insaturados (AGP). O cultivo controle apresentou 53,61, 21,90 e 21,72% para AGS, AGM e AGP, respectivamente. Silva *et al.* (2023) apresentam um perfil de ácidos graxos semelhantes ao encontrado no presente estudo, 54,14% de AGS, 10,34% de AGM e 21,50% de AGP.

A alta concentração de AGS identificada neste estudo, pode ser justificada pelo elevado tempo de iluminação do cultivo *outdoor*. Nesse período, há uma maior produção de ATP e NADPH, que auxiliam a distribuição do excesso de energia luminosa e previnem danos celulares (Khoeyi *et al.*, 2012). Também é relatado por Cardoso *et al.* (2020) que grandes quantidades de sais estimulam a síntese de dessaturase, enzima que ajuda na produção desses AGS.

Tabela 6 - Composição de ácidos graxos em *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 suplementado com 30% de AP (AP30) e cultivo controle (meio BG-11).

Classe	Ácido graxo	%		
		Controle	AP30	
Saturados	C4:0	Ácido butírico	1,66 ± 0,45	2,00 ± 0,47
	C11:0	Ácido undecanóico	0,59 ± 0,27	ND
	C13:0	Ácido tridecanóico	6,57 ± 2,44	5,99 ± 0,21
	C14:0	Ácido mirístico	4,10 ± 1,82	3,26 ± 0,06
	C15:0	Ácido pentadecanóico	2,50 ± 1,06	2,18 ± 0,54
	C16:0	Ácido palmítico	35,10 ± 0,61	38,04 ± 0,25
	C17:0	Ácido heptadecanóico	3,10 ± 1,14	6,87 ± 0,16
	C18:0	Ácido esteárico	ND	4,45 ± 0,14
	Total	53,61±7,79^a	62,78±0,62^a	
Monoinsaturados	C17:1	Ácido cis-10-heptadecanóico	6,89 ± 2,9	5,99 ± 0,3
	C18:1cis	Ácido elaídico	15,01 ± 14,15	6,56 ± 1,47
	Total	21,90±11,25^a	12,55±1,17^a	
Poli-insaturados	C18:2 cis	Ácido linolelaídico	11,2 ± 1,07	13,0 ± 0,66
	C18:2 trans	Ácido linoleico	2,29 ± 0,74	1,99 ± 0,07
	C18:3n3	Ácido α-linolênico	8,23 ± 4,02	9,70 ± 1,2
	Total	21,72±2,20^a	24,69±1,79^a	
Não identificados			2,79 ± 1,28	ND

ND: Não detectado.

Os principais ácidos graxos do tratamento AP30 foram C16:0, C18:1cis, C18:2cis, C18:3w3 e C17:1. Grandes concentrações de AGS das famílias C16:0 e C18:0 ocorrem devido à ação da acetil-CoA carboxilase. Essa enzima converte o carbono presente no meio por alongamento e dessaturação em malonil-CoA, formando principalmente cadeias carbônicas C16:0 e C18:0 (Cardoso *et al.*, 2020).

A diversidade e o perfil de ácidos graxos observados no tratamento AP30 potencializa a possibilidade de obter biodiesel de alta qualidade a partir da biomassa produzida. Altas concentrações de C16:0 e C18:3, principais ácidos graxos, desempenham um papel crucial na melhoria das propriedades do biodiesel. O nível de saturação é benéfico para produzir biodiesel de alta qualidade. Uma maior quantidade de ácidos graxos saturados melhora a qualidade da ignição, enquanto uma menor porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados ajuda a prevenir a auto-oxidação. (Cardoso *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2023).

6.6 PRODUÇÃO TEÓRICA DE BIOETANOL

A produção teórica de etanol a partir dos carboidratos da biomassa de *C. vulgaris* no tratamento AP30 foi de 8,32 mL 100 g⁻¹ e estatisticamente maior que a produção calculada no cultivo controle, 5,06 mL 100 g⁻¹. Neste estudo, o valor teórico de etanol foi inferior ao encontrado por Silva *et al.* (2023) no cultivo de *C. vulgaris* também em 30% de água produzida suplementada com meio BG-11 em fotobiorreatores tipo Erlenmeyer, que encontraram 17,02mL 100 g⁻¹ do valor teórico de etanol.

Os valores teóricos de bioetanol encontrados nas microalgas mostram uma promissora alternativa na produção de biocombustíveis. Isso se deve ao conteúdo de carboidratos, como amido e celulose, que são ideais para a produção de bioetanol. A ausência de lignina e a não presença de células recalcitrantes facilitam a conversão dos açúcares em etanol, reduzindo assim os custos associados ao processamento e ao pré-tratamento (Duarte *et al.*, 2019).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo de *Chlorella vulgaris* em água produzida no biorreator tipo *raceway* resultou em uma produção significativa de biomassa, demonstrando que a microalga se adapta bem a 30% de água produzida, quando submetida a ampliação de escala e sistema *outdoor*. Além disso, houve a síntese de biomoléculas de alto valor agregado, como carboidratos (3,67%), que podem ser convertidos em bioetanol, proteínas (24,77%) e lipídios (6,14%). O perfil de ácidos graxos da biomassa indica potencial para a produção de biodiesel de qualidade, contendo 62,78% de ácidos graxos saturados, 12,55% de monoinsaturados e 24,69% de polinsaturados. Portanto, a biomassa obtida no tratamento com AP se mostra uma alternativa promissora, não apenas para biorremediar a água residual, mas também como uma fonte de biocombustíveis utilizando um efluente gerado pela própria indústria petrolífera. Combinando o efeito de biorremediação da *Chlorella vulgaris*, submetida ao tratamento AP30, com a produção de biomoléculas e bioprodutos de alto valor agregado, essa abordagem se destaca como uma solução sustentável e eficiente para indústria.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIOLI, T.; CALIJURI, M.C. *Cultivo de microalga Chlorella sp. em pequena escala visando ao aumento da produção de biomassa e óleos para biodiesel*. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento - Universidade de São Paulo. 2014

AL-GHOUTI, M.; AL-KAABI, M.; ASHFAQ, M.; ADEL DA'NA, D. *Produced water characteristics, treatment and reuse: a review*. Journal of water process engineering, v.28, p. 222–239, 2019.

AMMAR, S.; KHADIM, H.; MOHAMED, A. *Cultivation of Nannochloropsis oculata and Isochrysis galbana microalgae in produced water for bioremediation and biomass production*. Environmental technology & innovation, v. 10, p. 132-142, 2018.

ANDRADE B.B.; CARDOSO L.G.; ASSIS D.J.; COSTA J.A.V.; DRUZIAN J.I.; LIMA S.T.C. *Production and characterization of Spirulina sp. LEB18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor*. J. Bioresource Technology (2019). DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.144

ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. *Cultivation of microalgae Pseudokirchneriella subcapitata in bench scale using medium contaminated with heavy metals*. Eng. sanit ambient, v.21 n.3, p. 603-608, jul/set 2016.

ARCILA J.S.; BUTRÓN G. *Influence of solar irradiance levels on the formation of microalgae-bacteria aggregates for municipal wastewater treatment*. Algal Res, v.27, p. 190–197, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2017.09.011

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

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), *Official methods of analysis*. 18th ed. Washington (2005).

BHUVANA, P.; SANGEETHA, P.; ANURADHA, V. ALI, M. *Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: N. Oculata and C.Vulgaris*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 19, p.101094, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101094

BORGES, A.V.S.; ANDRADE, B.B.; SANTANA, J.S.; MEDEIROS, R.M.A.; SOUZA, C.O.; ASSIS, D. J.; SILVA, J.B.A.; TAVARES, P.P.L.G.; CARDOSO, L.G.

Biopolymers Synthesized by Microalgae Grown in Wastewater: a Technological Survey. BioEnergy Research, v. 17, p. 73-86, 2024. DOI: 10.1007/s12155-023-10680-w

BRAR A.; KUMAR M.; VIVEKANAND V.; PAREEK N. *Phycoremediation of textile effluent contaminated water bodies employing microalgae: nutrient sequestration and biomass production studies.* Int J Environ Sci Technol., v. 16, p. 7757–7768, 2018.

CARDOSO L.G.; DUARTE J.H.; ANDRADE B.B.; LEMOS P.V.F.; COSTA J.A.V.; DRUZIAN J.I.; CHINALIA F.A. *Spirulina* sp. *LEB18* cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: high biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. Aquaculture, v. 252, p. 735272, 2020.

CARDOSO, L.G.; DUARTE, J.H.; COSTA, J.A.V.; ASSIS, D.J.; LEMOS, P.V.F.; DRUZIAN, J.I.; SOUZA, C.O.; NUNES, I.L.; CHINALIA, F.A. *Spirulina* sp. as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel. BioEnergy Research, v. 14, p. 254-264, 2021.

CÉSAR, S.D.; DE JAGER, D.; NJOYA, M.. *Environmental trade-offs in energy production: A review of the produced water life cycle and environmental footprint.* Marine Pollution Bulletin, v. 203, p. 116480, jun. 2024. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2024.116480.

CHURCH J.; HWANG J.H.; KIM K.T.; MCLEAN R.; OH Y.K.; NAM B.; JOO J.C.; LEE W.H. *Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of Chlorella vulgaris in synthetic saline wastewater for biofuel production.* Bioresour Technol, v. 243, p. 147–153, 2017.

CORONADO-REYES, J. A., SALAZAR-TORRES, J. A., JUÁREZ-CAMPOS, B., & GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C. *Chlorella vulgaris, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review.* Food Science and Technology, v.42, p. 37320, 2020. DOI: 10.1590/fst.37320

DUARTE J.H.; CARDOSO L.G.; SOUZA C.O.; NUNES I.L.; DRUZIAN J.I.; MORAIS M.G.; COSTA J.A.V. *Brackish groundwater from brazilian backlands in Spirulina cultures: potential of carbohydrate and polyunsaturated fatty acid production.* Applied biochemistry and biotechnology, v. 190, p. 907-917, 2019.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry (1946), 28(3), 350-356.

EPA, Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268. Environmental monitoring systems laboratory office of research and development U.S. *Method 300.0 Determination of inorganic anions by ion chromatography*. Revision 2.1 (1993).

EPA, Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio. *Method 6020A, Inductively coupled plasma - Mass spectrometry*. Revision 1 (1998).

EPA, Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio. Method 8015D (SW-846):*Nonhalogenated Organics using GC-FID*. Revision 4 (2003).

EVANS, L.; HENNIGEB, S.J.; WILLOUGHBYC, N.; ADELOYED, A.J.; SKROBLINE, M.; GUTIERREZ, T. *Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by Chlorella vulgaris*. Algal Research. V.24, p. 368–377, 2017.

FOLCH J.; LEES M.; SLOANE G.H.S. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J Biol Chem 226 (1957) 497–509. 10.1016/S0021-9258(18)64849-5

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

JAAFARI J., YAGHMAEIAN K. *Optimization of heavy metal biosorption onto freshwater algae (Chlorella coloniales) using response surface methodology (RSM)*. Chemosphere. V. 217, p. 447-455, 2019. DOI: 10.1016/j.eti.2021.102204

JAWAHARRAJ K.; KARPAGAM R.; ASHOKKUMAR B.; PRATHEEBA C.N.; YARALAKSHMI P. *Enhancement of biodiesel potential in cyanobacteria: using agro-industrial wastes for fuel production, properties and acetyl CoA carboxylase D (accD) gene expression of Synechocystis sp.NN*. Renewable Energy, v. 98, p. 72–77, 2016. DOI: 10.1016/j.renene.2016.02.038

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

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

KUMAR A.N.; CHATTERJEE S.; HEMALATHA M.; ALTHURI A.; MIN B.; KIM S.H.; MOHAN S.V. *Deoiled algal biomass derived renewable sugars for bioethanol and biopolymer production in biorefinery framework*. Bioresour Technol, v. 296, p. 122315, 2020.

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

LAKE, Larry W., ed. *Petroleum Engineering Handbook*. Society of Petroleum Engineers, 2007.

LAWTON, R. J.; DE NYS, R.; MAGNUSSON, M.E.; PAUL, N.A. *The effect of salinity on the biomass productivity, protein and lipid composition of a freshwater macroalga*. Algal Research, v. 12, p. 213-220, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.09.001.

LICHTENTHALER H.; BUSCHMANN C. *Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy*. J. ResearchGate (2001). <https://www.researchgate.net/publication/200037314>

MA X.; CHEN Y.; LIU F.; ZHANG S.; WEI Q. (2021) *Enhanced tolerance and resistance characteristics of Scenedesmus obliquus FACHB-12 with K3 carrier in cadmium polluted water*. Algal Research, v.55, p. 102267, 2021. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102267

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

MILHAZES-CUNHA H.; OTERO A. *Valorisation of aquaculture effluents with microalgae: the Integrated Multi-Trophic Aquaculture concept*. Algal Res., v. 24, p. 416-424, 2017.

MOTTA, A.; BORGES, C.; KIPERSTOK, A.; ESQUERRE, K.; ARAUJO, P. M.; BRANCO, L.P.N. *Produced water treatment for oil removal by membrane separation process: review. Revista Engenharia Sanitária*, v. 18, n. 1, p. 15-26, 2013.

MURATA M.M.; MORIOKA L.R.I.; MARQUES J.B.S.; BOSSO A.; SUGUIMOTO H. (2021) *What do patents tell us about microalgae in agriculture?* *AMB Expr.*, v. 11, 2021. DOI: 10.1186/s13568-021-01315-4

NGUYEN T.D.P.; VO C.T.; NGUYEN-SY T.; TRAN T.N.T.; LE T.V.A; CHIU C.Y.; SANKARAN R.; SHOW P.L. *Utilization of microalgae for self-regulation of extracellular polymeric substance production. Biochem Eng J*, v. 159, p. 107616, 2020. DOI: 10.1016/j.bej.2020.107616

PRICE S.; KUZHIUMPARAMBIL U.; PERNICE M.; RALPH P.J. *Cyanobacterial polyhydroxybutyrate for sustainable bioplastic production: critical review and perspectives. J Environ Chem Eng*, v. 8(4), p. 104007, 2020. DOI: 10.1016/j.jece.2020.104007

RIPPKA R.; DERUELLES J.; WATERBURY J.B.; HERDMAN M.; STANIER R.Y. *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*, *Journal of General Microbiology* 111 (1979) 1-61. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; VACA-GARCIA, C. *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, 265–278, 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007

SILVA D.A.; CARDOSO L.G.; SILVA J.S.J.; SOUZA C.O.; LEMOS P.V.F.; ALMEIDA P.F.; FERREIRA E.S.; LOMBARDI A.T.; DRUZIAN J.I. *Strategy for the cultivation of Chlorella vulgaris with high biomass production and biofuel potential in wastewater from the oil industry. Environmental Technology & Innovation. V. 25*, p. 102204, 2022. DOI: 10.1016/j.eti.2021.102204

SILVA, J.S.J.; SILVA, D. A.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; NASCIMENTO, R.Q.; LEMOS, P.V.F.; LOMBARDI, A.T.; ALMEIDA, P.F.; FRANÇA, J.S.; SOUZA, C.O.; CARDOSO, L.G. *Luminosity and Chemical Stress Improve the Production of Biomass and Biomolecules from Chlorella vulgaris Cultivated in Produced Water. BioEnergy Research*, v. 16, p. 2465-2478, 2023. DOI: 10.1007/s12155-023-10596-5.

SMWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 4500-P Phosphorus (2017).

SOUZA C.O.; LEITE M.E.Q.; LASEKAN J.; BAGGS G.; PINHO L.S.; DRUZIAN J.I.; RIBEIRO T.C.M.; MATTOS A.P.; MENEZES-FILHO J.A.; COSTA-RIBEIRO H. *Milk proteins-based formulas containing diferente oils affect fatty acids balance in term infants: A randomized blinded crossover clinical trial*. J. Lipids Health Dis. (2017) 16:78. DOI: 10.1186/s12944-017-0457-y.

TANG C.C.; ZHANG X.; HE Z.W.; TIAN Y.; WANG X.C. *Role of extracellular polymeric substances on nutrients storage and transfer in algal-bacteria symbiosis sludge system treating wastewater*. Bioresour Technol, v. 331, p. 125010, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125010

TOLLIVER C.; FUJII H.; KEELEY A.R.; MANAGI S. *Green Innovation and Finance in Asia*. Asian Economic Policy Review, v.16, p. 67-87, 2020.

VO H.N.P.; NGO H.H.; GUO W.; NGUYEN K.H.; CHANG S.W.; NGUYEN D.D.; LIU Y.; LIU Y.; DING N.; BUI X.T. *Micropollutants cometabolism of microalgae for wastewater remediation: effect of carbon sources to cometabolism and degradation products*. Water Res, v. 183, p. 115974, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115974

WANG J.; LIU S.; HUANG J.; CUI R.; XU Y.; SONG Z. *Genetic engineering strategies for sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production from carbon-rich wastes*. Environ Technol Innov, v. 30, p. 103069, 2023. DOI: 10.1016/j.eti.2023.103069

WANG M.; KUO-DAHAB W.C.; DOLAN S.; PARK C. *Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, Chlorella sp. and Micractinium sp., in wastewater treatment*. Bioresour Technol, v. 154, p.131–137, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.047

WANG S.; JI B.; ZHANG M.; MA Y.; GU J.; LIU Y. *Defensive responses of microalgal-bacterial granules to tetracycline in municipal wastewater treatment*. Bioresour Technol, v.312, p.123605, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123605

XIE P.; CHEN C.; ZHANG C.; SU G.; REN N.; HO S.H. *Revealing the role of adsorption in ciprofloxacin and sulfadiazine elimination routes in microalgae*. Water Res, v.172, p.115475, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115475

YANG Q.; XU W.; LUAN T.; PAN T.; YANG L.; LIN L. *Comparative responses of cell growth and related extracellular polymeric substances in Tetraselmis sp. to nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol*. Environ Pollut, v. 274, p.116605, 2021. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116605

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

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

ZHIGANG, G.E.; HUI, Z.; CHENG, Y.; YONGJUN, Z. *Purifying synthetic high-strength wastewater by microalgae Chlorella vulgaris under various light emitting diode wavelengths and intensities*. Journal of Environmental Health Science and Engineering, v.11, p.8, 2013.

ZNAD, H.; AL KETIFE, A.M.D.; JUDD, S.; ALMOMANI, F.; VUTHALURU, H.B. *Bioremediation and nutrient removal from wastewater by Chlorella vulgaris*. Ecological Engineering, v. 110, p. 1-7, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2017.10.008.

APÊNDICE 1

BORGES, A.V.S.; ANDRADE, B.B.; SANTANA, J.S.; MEDEIROS, R.M.A.; SOUZA, C.O.; ASSIS, D. J.; SILVA, J.B.A.; TAVARES, P.P.L.G.; CARDOSO, L.G. *Biopolymers Synthesized by Microalgae Grown in Wastewater: a Technological Survey*. *BioEnergy Research*, v. 17, p. 73-86, 2024. DOI: 10.1007/s12155-023-10680-w

SANTOS, A.V.; MEDEIROS, R.M.A.; ANDRADE, B.B.; SILVA, J. S.J.; MOREIRA, I.T.A.; CARDOSO, L.G. *Cultivo de Chlorella Vulgaris em Escala Piloto Utilizando Água Produzida: Avaliação do Crescimento e Biorremediação*. In: ANAIS DO 24º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Salvador, 01-04 out. 2023. Anais eletrônicos

BORGES, A.V.S.; SOUZA, C.O.; CARDOSO, L.G.; ANDRADE, B.B.; ASSIS, D. *Produção e caracterização de bioplásticos obtidos em cultivo de microalgas em efluentes industriais*. In: CONGRESSO UFBA 2023, Salvador, 14-17 mar. 2023. Vídeo-Pôster.