

# Estudo estatístico da cinética de crescimento e teor de lipídeos de microalgas cultivadas em meios salobros, utilizando águas residuárias como fonte de nutrientes com fins bioenergéticos

Statistical study of the growth kinetics and lipid content of microalgae cultivated in brackish media, using wastewater as a source of nutrients for bioenergetic purposes

Estudio estadístico de la cinética de crecimiento y contenido lipídico de microalgas cultivadas en medio salobre, utilizando aguas residuales como fuente de nutrientes con fines bioenergéticos

Recebido: 28/06/2022 | Revisado: 09/07/2022 | Aceito: 14/07/2022 | Publicado: 21/07/2022

**Bruna da Silveira Guimarães**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9890-6158>  
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
E-mail: [brunasilveiraguimaraes@hotmail.com](mailto:brunasilveiraguimaraes@hotmail.com)

**Kepler Borges França**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5456-2066>  
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
E-mail: [kepler123@gmail.com](mailto:kepler123@gmail.com)

**João Alexandre Rodrigues Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6883-2135>  
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
E-mail: [joao.alexandrern@gmail.com](mailto:joao.alexandrern@gmail.com)

**Carolina Pereira Dantas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7921-0179>  
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
E-mail: [carolinapdantas@yahoo.com.br](mailto:carolinapdantas@yahoo.com.br)

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo comprovar, estatisticamente, a influência da concentração de nutrientes provenientes de águas fósicas na cinética de crescimento e acumulação lipídica intracelular em microalgas. Foram estudadas as espécies *Chlorella* sp., *Scenedesmus acuminatus*, *Nannochloropsis* sp., *Monoraphidium contortum* e *Pediastrum tetras*, as quais foram isoladas da região semiárida nordestina brasileira e cultivadas na mistura composta por água subterrânea salobra e efluente oriundo de fossas sépticas. A partir dos cultivos foram analisados os parâmetros cinéticos, produção de biomassa seca e teor de lipídeos, utilizando como ferramenta o planejamento experimental para um fator, tendo a concentração de nutrientes como variável independente. A velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), tempo de geração ( $t_g$ ), bem como o teor de lipídeos foram as variáveis resposta estudadas. Os resultados mostraram que as espécies que apresentaram maior acúmulo de lipídios foram *Chlorella* sp., com conteúdo lipídico de 81,20% e *Nannochloropsis* sp. com 73,68%, sendo as mais promissoras para fins bioenergéticos. Portanto, a concentração de nutrientes provenientes de efluentes fósicos aliada à salinidade do meio atuaram diretamente no crescimento celular e teor de lipídeos, podendo tais fatores serem utilizados como artifício para potencializar a produção lipídica, visando a produção de biocombustíveis.

**Palavras-chave:** Reuso; Águas salobras; Biotecnologia; Biocombustíveis; Biomassa; Lipídeos.

## Abstract

The present work aimed to prove, statistically, the influence of the concentration of nutrients from fossil waters on the growth kinetics and intracellular lipid accumulation in microalgae. The species *Chlorella* sp., *Scenedesmus acuminatus*, *Nannochloropsis* sp., *Monoraphidium contortum* and *Pediastrum tetras* were studied, which were isolated from the semiarid region of the Brazilian northeast and cultivated in a mixture composed of brackish groundwater and effluent from septic tanks. From the crops, the kinetic parameters, dry biomass production and lipid content were analyzed, using the experimental planning for one factor as a tool, with the concentration of nutrients as an independent variable. The maximum growth velocity ( $\mu_{\max}$ ), generation time ( $t_g$ ), as well as the lipid content were the studied response variables. The results showed that the species with the greatest accumulation of lipids were *Chlorella* sp., with a lipid content of 81.20%, and *Nannochloropsis* sp. with 73.68%, being the most promising for bioenergetic purposes. Therefore, the concentration of nutrients from fossil effluents combined with the salinity of the medium acted directly on cell growth and lipid content, and such factors can be used as an artifice to enhance lipid production, aiming at the production of biofuels.

**Keywords:** Reuse; Brackish water; Biotechnology; Biofuels; Biomass; Lipids.

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo probar estadísticamente la influencia de la concentración de nutrientes de aguas fósiles sobre la cinética de crecimiento y acumulación de lípidos intracelulares en microalgas. Se estudiaron las especies *Chlorella* sp., *Scenedesmus acuminatus*, *Nannochloropsis* sp., *Monoraphidium contortum* y *Pediastrum tetras*, que fueron aisladas de la región semiárida del Nordeste brasileño y cultivadas en una mezcla compuesta de aguas subterráneas salobres y efluentes de fosas sépticas. De los cultivos se analizaron los parámetros cinéticos, producción de biomasa seca y contenido de lípidos, utilizando como herramienta el diseño experimental para un factor, con la concentración de nutrientes como variable independiente. La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), el tiempo de generación ( $t_g$ ), así como el contenido de lípidos fueron las variables de respuesta estudiadas. Los resultados mostraron que las especies que presentaron mayor acumulación de lípidos fueron *Chlorella* sp., con un contenido de lípidos de 81,20% y *Nannochloropsis* sp. con un 73,68%, siendo el más promisorio para fines bioenergéticos. Por lo tanto, la concentración de nutrientes de los efluentes fósiles combinada con la salinidad del medio actuó directamente sobre el crecimiento celular y el contenido de lípidos, y estos factores pueden utilizarse como un dispositivo para mejorar la producción de lípidos, con el objetivo de producir biocombustibles.

**Palabras clave:** Reutilización; Agua salobre; Biotecnología; Biocombustibles; Biomasa; Lípidos.

## 1. Introdução

A utilização de biocombustíveis tem se mostrado uma alternativa viável para solucionar a dependência dos derivados de petróleo, podendo estes serem produzidos a partir de matérias-primas como amido, óleos vegetais, gorduras animais, resíduos de biomassa e biomassa de algas. Como benefícios ambientais os biocombustíveis diminuem as emissões de CO<sub>2</sub>, hidrocarbonetos e materiais particulados, além da eliminação das emissões de compostos do tipo SO<sub>x</sub>, com consequente redução dos gases do efeito estufa. Mais especificamente os biocombustíveis derivados de microalgas, a capacidade de captação do CO<sub>2</sub> destes microrganismos é entre 10 e 50 vezes maiores que muitas plantas superiores. Desse modo, se observa uma maior eficiência fotossintética, com relação às plantas superiores, o qual é um dos pontos positivos para a utilização como matéria-prima para a produção de biodiesel (Zhu *et al.*, 2017).

Carneiro *et al.* (2018) mostram que o Governo Federal brasileiro resolveu, através do Conselho Interministerial do Açúcar e do Alcool (Cima), aumentar o teor obrigatório de adição de etanol anidro de 25% para 27% na gasolina comum. Concomitantemente, a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis alterou a Lei 13.033/2014 pela Lei 13.263/2016, a qual implementou um cronograma de aumento do teor do biodiesel a partir de 2017, com aumentos gradativos de 8%, 9% e 10% a partir deste ano.

Mota *et al.* (2022) relatam que até o ano de 2050 o interesse pelo consumo de fontes de energia renováveis aumentará substancialmente. Nesse cenário, a biomassa de microalgas como matéria prima para a produção de biodiesel é considerada pela comunidade científica como de grande potencial, devido às características físico-químicas serem semelhantes às de óleos vegetais. Os biocombustíveis, mais especificamente os derivados da biomassa de microalgas, apresentam grande potencial, sendo estes produzidos a partir da reação de um óleo com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador. Tais microrganismos unicelulares e fotossintetizantes convertem a energia solar em energia química. Estudos mostram que a capacidade de produção de biomassa de microalgas por unidade de área é bastante considerável e, o potencial para a extração do óleo se mostra maior que o de plantas superiores oleaginosas.

Shuba e Kifle (2018) ainda ressaltam que a produtividade de produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas geralmente pode superar os valores das melhores culturas produtoras de óleo. Mostram também que, se comparada com as demais culturas, a biomassa de microalgas tem mais potencial para produção, sem no entanto, afetar negativamente a oferta de alimentos e demais produtos de origem agrícola, já que os cultivos podem ser realizados em terras não aráveis, não utilizadas para estes fins. Desse modo, não há a competição territorial com culturas destinadas para fins alimentícios.

Bellou *et al.* (2014) abordam que algumas espécies de microalgas são capazes de acumular quantidades consideráveis de lipídeos, principal matéria-prima para a produção de biodiesel, sendo comparadas a plantas superiores oleaginosas. Zhao *et al.* (2021) mostram que o estresse salino é um artifício amplamente utilizado e pesquisado para maximizar a síntese de lipídeos

nas microalgas, já que são processos mais viáveis, economicamente falando. Qiao *et al.* (2021) ainda destacam que provocar o estresse salino afeta diretamente em mecanismos fisiológicos e bioquímicos ligados ao crescimento celular e consequente produção de biomassa, causando estresse iônico, osmótico e oxidativo. Alterações iônicas e osmóticas causadas pelo estresse salino reduz a atividade do íon  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ , o que causa impacto na atividade fotossintética. Dessa forma, durante a acumulação lipídica o meio salino provoca nas células microalgais um aumento no estresse oxidativo ou acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

Zhang *et al.* (2017) ainda ressaltam que a compreensão do mecanismo regulador para a produção de lipídeos em células de microalgas é importante no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis derivados da biomassa microalgal. Chew *et al.* (2018) mostram que pesquisas recentes com as espécies *Tetraselmis suecica* e *Nannochloropsis oculata* evidenciam o alto potencial para a produção de biodiesel, sendo consideradas espécies adequadas para a produção em larga escala. Tais pesquisas também demonstraram que algumas espécies, tais como *T. suecica*, são capazes de crescer em meios salinos e salobros devido à presença de bombas de  $\text{Na}^+$ , que atuam no mecanismo osmorregulatório das células, fazendo-as adaptáveis a mudanças rápidas e graduais na salinidade em uma larga faixa.

Srivastava *et al.* (2017) abordam que a salinidade do meio contribui significativamente na síntese de lipídeos neutros, mais especificamente os triacilglicérides (TAG) na forma de metabólito secundário, possibilitando que as células microalgais suportem o aumento da salinidade. A exploração destes fatores pode ser de vital importância, implicando na viabilidade econômica da produção de microalgas em larga escala, para fins bioenergéticos. O autor ainda destaca que a salinidade do meio interfere ainda na taxa de respiração, assimilação de nutrientes e captação de carbono.

Pancha *et al.* (2015) mostram que o estresse salino tem sido estudado nos cultivos de espécies como *Chlamydomonas* sp., *Desmodesmus abundans* e *Nannochloropsis* sp. No seu trabalho o autor estudou o efeito da salinidade no crescimento da microalga de água doce *Scenedesmus* sp. Os autores observaram que o estresse salino provocou alterações fisiológicas, bioquímicas e de crescimento. Foram analisados parâmetros como produção de biomassa, teor lipídico, carboidratos, proteínas, pigmentos fotossintéticos, conteúdos minerais, entre outros. Os resultados mostraram aumento nos níveis lipídicos e de carboidratos nos cultivos realizados em uma única fase, porém com menores quantidades de biomassa.

Abdel-Raouf, Al-Homaidan e Ibraheem (2012) ressaltam que grandes concentrações de substâncias orgânicas e inorgânicas são descartadas no ambiente aquático, sendo estas o resultado de atividades domésticas, da agricultura e industriais. Em muitos casos as águas residuais domésticas urbanas e rurais são liberadas diretamente nos corpos d'água, sem um tratamento prévio. Observa-se que nos locais onde não há uma rede de esgoto, bem como uma estação de tratamento nas zonas rurais, os descartes destes rejeitos vem aumentando ao longo dos anos. Zhang, et al. (2021) mostram ainda que o lodo ativado como processo convencional de tratamento de efluentes, não é eficiente na remoção de componentes como o nitrogênio e fósforo. Desse modo, o descarte destes efluentes nos corpos d'água provoca o processo de eutrofização nestes e o desequilíbrio do ecossistema.

Desse modo, estudos mostram que a utilização de águas residuárias domésticas pode ser uma fonte viável de nutrientes para o cultivo de microalgas. Salama *et al.* (2017) destacam o baixo custo de tais efluentes, além dos benefícios ambientais de sua utilização mencionados, devido à absorção dos nutrientes, sendo a maior parte deles na forma de nitrato, amônia, fosfato, ureia e traços de minerais. Para a produção de biomassa de microalgas os três principais nutrientes, que são os de maior absorção são o carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), sendo importante observar a relação molar entre tais componentes, devendo ser a mesma relação estequiométrica da biomassa de microalgas, evitando assim inibição no crescimento.

Razzak *et al.* (2017) mostram que os nutrientes presentes em águas residuais são classificados em macronutrientes, sendo eles carbono, nitrogênio e fósforo e micronutrientes, que são os traços de metais e vitaminas. Os componentes nitrogenados e fosforados mais encontrados são nitrato, nitrito, amônia, nitrogênio orgânico e fosfato. Kadir *et al.* (2018) ressaltam que as

microalgas removem os nutrientes inorgânicos do meio em simbiose com bactérias, que degradam a matéria orgânica através do consumo do O<sub>2</sub> produzido pelas microalgas no processo fotossintético.

Quanto ao processo de absorção de nutrientes Salama *et al.* (2017) afirmam que dentre eles estão os macronutrientes (C, N, P, H, O, S, Mg, K, Na e Ca) e os micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, Cl, V, Mo, B, Co e Si). Os macronutrientes são utilizados na construção de materiais, enquanto que os micronutrientes são elementos metálicos, que participam da constituição de enzimas envolvidas em reações biológicas. Dentre estes, elementos como Mn, Zn, Cu, Ca e Fe estão relacionados com a atividade fotossintética. Íons metálicos como Cl e Mn tem papel na produção de O<sub>2</sub>

Com base na revisão bibliográfica e nos conhecimentos dos autores, não se encontrou estudos que comprovem estatisticamente a influência, positiva ou negativa, da concentração de nutrientes na cinética de crescimento e no teor de lipídeos intracelulares de microalgas. O presente trabalho tem como objetivo comprovar, através do planejamento experimental para um fator, a influência da concentração de nutrientes oriundos de efluentes domésticos no crescimento e acumulação de lipídeos em cinco espécies de microalgas.

Como meio de cultivo foram utilizadas águas salobras subterrâneas, de poço perfurado na região semiárida do nordeste brasileiro. A fonte de nutrientes veio exclusivamente de águas residuárias domésticas oriundas de fossas sépticas. A utilização desta mistura se deu visando diminuir os custos de produção da biomassa microalgal, sendo analisado o potencial de produção de biodiesel, a partir da análise de teor de lipídeos, bem como foi quantificada a produção de biomassa seca por litro de cultivo. Dessa forma, a partir do monitoramento do crescimento em cada meio e da comparação destes com o meio de cultivo sintético, o trabalho analisa quais espécies aumentaram o crescimento celular, produção de biomassa e acumulação lipídica, comprovando, assim o potencial para a produção de biodiesel.

## 2. Metodologia

O estudo foi executado em um ambiente controlado, localizado no Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES), localizado na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Foram utilizadas cinco cepas de espécies, isoladas na região semiárida do nordeste brasileiro. As espécies utilizadas foram as seguintes: *Chlorella* sp., *Scenedesmus acuminatus*, *Nannochloropsis* sp., *Monoraphidium contortum* e *Pediastrum tetras*. A *Scenedesmus acuminatus*, *Monoraphidium contortum*, *Pediastrum tetras* e *Nannochloropsis* sp. foram replicadas em meio de cultivo sintético *Water Culture*, preconizado por Guillard e Lorenzen (1972). A *Chlorella* sp. foi replicada em meio sintético *Bold's Basal Medium*, com composição descrita por Bischoff e Bold (1963).

A metodologia empregada para os cultivos foi desenvolvida pelos autores. Os cultivos foram fechados, em fotobiorreatores. Foi utilizado como meio de cultivo a mistura água de poço e efluente de fossas sépticas, com volume de cultivo de 2 litros, utilizando as proporções de 5%, 10%, 30%, 50% e 80% em volume de esgoto diluído em água subterrânea salobra. Além destes, as cepas também foram inoculadas no meio sintético, sem a adição de sais, denominado *Controle*, para comparação com os demais. O ambiente de cultivo foi controlado, com a temperatura entre 22.0 e 25.0°C, baseado em Chisti (2008), que recomenda uma faixa entre 20,0 e 30,0°C no cultivo de microalgas. Foi utilizado fotoperíodo 12/12h claro/escuro (384.0 lux) e aeração constante, através de microbombas, a uma vazão de 150.0 L.h<sup>-1</sup>. A Figura 1 mostra os cultivos fechados realizados em ambiente controlado.

**Figura 1:** Cultivo fechado com água de poço e efluente de fossas sépticas.



Fonte: Autores.

Após esta etapa, foi realizado o acompanhamento do crescimento celular unicamente pela contagem diária do número de células por mL, visando o cálculo dos parâmetros cinéticos, a partir da observância das fases de crescimento, conforme mostram Lee *et al.* (2015). Os autores relatam que o crescimento microalgal em batelada possui seis fases; a *lag*, exponencial ou log, linear, de declínio de crescimento, estacionária e de morte. Além disso, este processo também teve o propósito de visualizar as células viáveis e não viáveis em cada meio de cultivo. O monitoramento do pH também ocorreu, visando a observância de alterações no meio.

As contagens foram realizadas até que fosse atingida a fase de crescimento estacionário das células, sendo o tempo de cultivo para a *Chlorella sp.* de dez dias, dezoito dias para a *Scenedesmus acuminatus*, entre 15 e 16 dias para a *Nannochloropsis sp.*, 13 e 14 dias para a *Monoraphidium contortum* e *Pediastrum tetras*. Com os dados obtidos foram plotadas as curvas de crescimento e observado o início e fim da fase exponencial para os cálculos cinéticos. Após atingido o número máximo de células, a biomassa foi separada por centrifugação e seca em estufa a 45,0°C para verificação do teor de lipídeos, conforme metodologia preconizada por Folch, Less e Stanley, (1957) modificada para microalgas. Porém, antes foi calculada a produção de biomassa seca por litro de cultivo, através da pesagem.

A partir dos resultados obtidos, foi feito um estudo estatístico usando o Teste de Hipóteses, a partir do planejamento experimental para um fator, testando-se a igualdade entre as médias dos parâmetros cinéticos e teor de lipídeos dos tratamentos. Este estudo se deu através do Teste F ( $\alpha = 0.05$ ), aplicando a análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, visando conhecer a influência da concentração de nutrientes (variável de entrada) no crescimento e produção lipídica das espécies, comparando-se os valores médios das variáveis resposta de cada meio com o *Controle*. Os níveis da variável independente variaram de acordo com proporção dos meios em estudo, ou seja, 0 (*Controle*), 5%, 10%, 30%, 50% e 80%. As variáveis resposta foram a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ , dada em  $\text{dia}^{-1}$ ), tempo de geração ( $t_g$ , dado em dia), dependentes das concentrações celulares obtidas através da contagem diária, e também foi analisado o teor de lipídeos. Os valores de  $\mu_{\max}$  e  $t_g$  foram calculados a partir das Equações 1 e 2, tal como abordam Schmidell *et al.* (2001), onde,  $X_i$  é a concentração celular (em células.mL<sup>-1</sup>) no início da fase exponencial e  $X$  é a concentração final nesta fase, assim como  $t_i$  é o tempo inicial da fase exponencial e  $t$  o tempo final, em dias. Com este tratamento foi possível comparar as médias dos parâmetros cinéticos nos níveis estudados com o *Controle*, sendo observado quais resultados apresentaram diferenças significativas.

$$\ln \frac{X}{X_i} = \mu_{\max} \cdot (t - t_i) \quad (1)$$

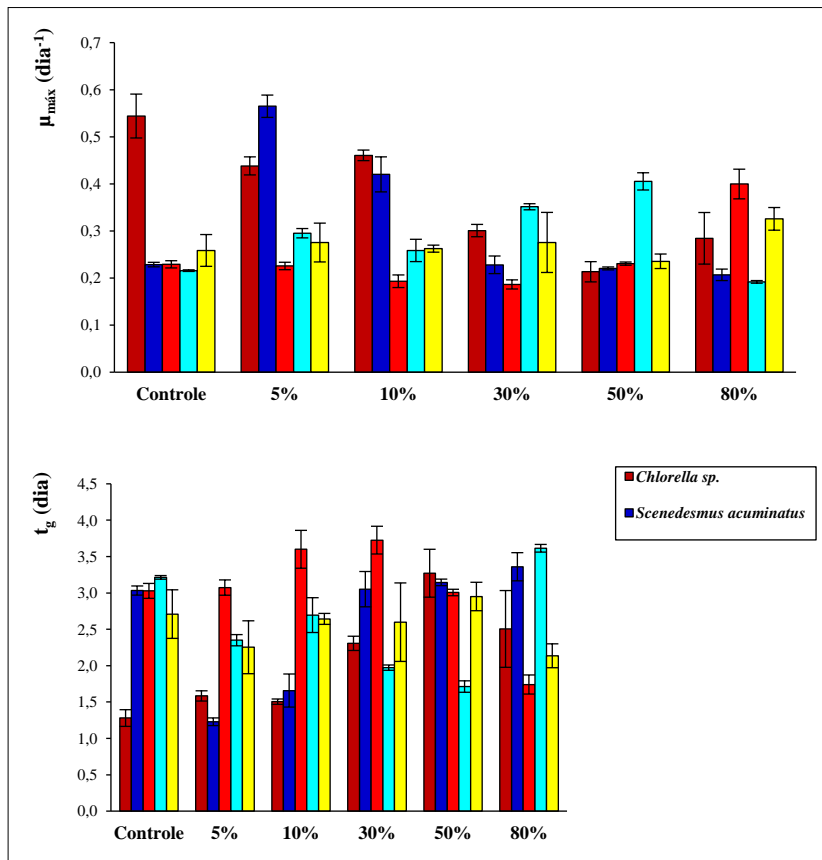
$$\mu_{\max} = \frac{\ln 2}{t_g} = \frac{0,693}{t_g} \quad (2)$$

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Cinética de Crescimento

Conforme mostra a Figura 2, o eixo X representa as proporções de nutrientes estudadas e o eixo Y os parâmetros cinéticos ( $\mu_{\max}$  e  $t_g$ ).

**Figura 2:** Velocidade máxima de crescimento e tempo de geração para todas as espécies estudadas nas diferentes proporções de fossa em água de poço.



Fonte: Autores.

Para a *Chlorella sp.* as proporções de 5% e 10% foram as que mais se aproximaram do Controle e a *Scenedesmus acuminatus* superou este meio nestas mesmas proporções. Já a *Nannochloropsis sp.* apresentou maiores valores de  $\mu_{\max}$  e menores de  $t_g$  no meio 80%, com resultados que superaram o Controle e os demais permaneceram em uma mesma faixa. Na *Monoraphidium contortum* os melhores resultados ocorreram nas proporções 30% e 50% e para a *Pediastrum tetras* isso ocorreu na proporção de 80%, não sendo percebida grandes variações nos demais meios.

A partir dos resultados obtidos é possível realizar comparações qualitativas entre as espécies, percebendo que a *Chlorella sp.* e *Scenedesmus acuminatus* tiveram o seu crescimento favorecido, em meios com maiores quantidades de água de poço salobra e menores concentrações de nutrientes. A *Nannochloropsis sp.* e *Pediastrum tetras* tiveram melhor crescimento no meio com menor quantidade de água salobra e maior concentração de nutrientes. A *Monoraphidium contortum* cresceu mais rapidamente nos meios com concentrações intermediárias. Dessa forma, o crescimento celular pode ser favorecido ou prejudicado devido à concentração de nutrientes do meio, a depender da espécie cultivada.

### 3.2 Análise estatística da cinética de crescimento

Como pode ser visto na Tabela 1 os valores de  $F_{\text{calculado}}$  são todos maiores que o  $F_{\text{tabelado}}$ , confirmando a diferença significativa entre os meios.

**Tabela 1:** Teste F para  $\mu_{\text{max}}$  e  $t_g$  com  $\alpha = 0,05$ . ( $F_{\text{tabelado}} = 4,48$ ).

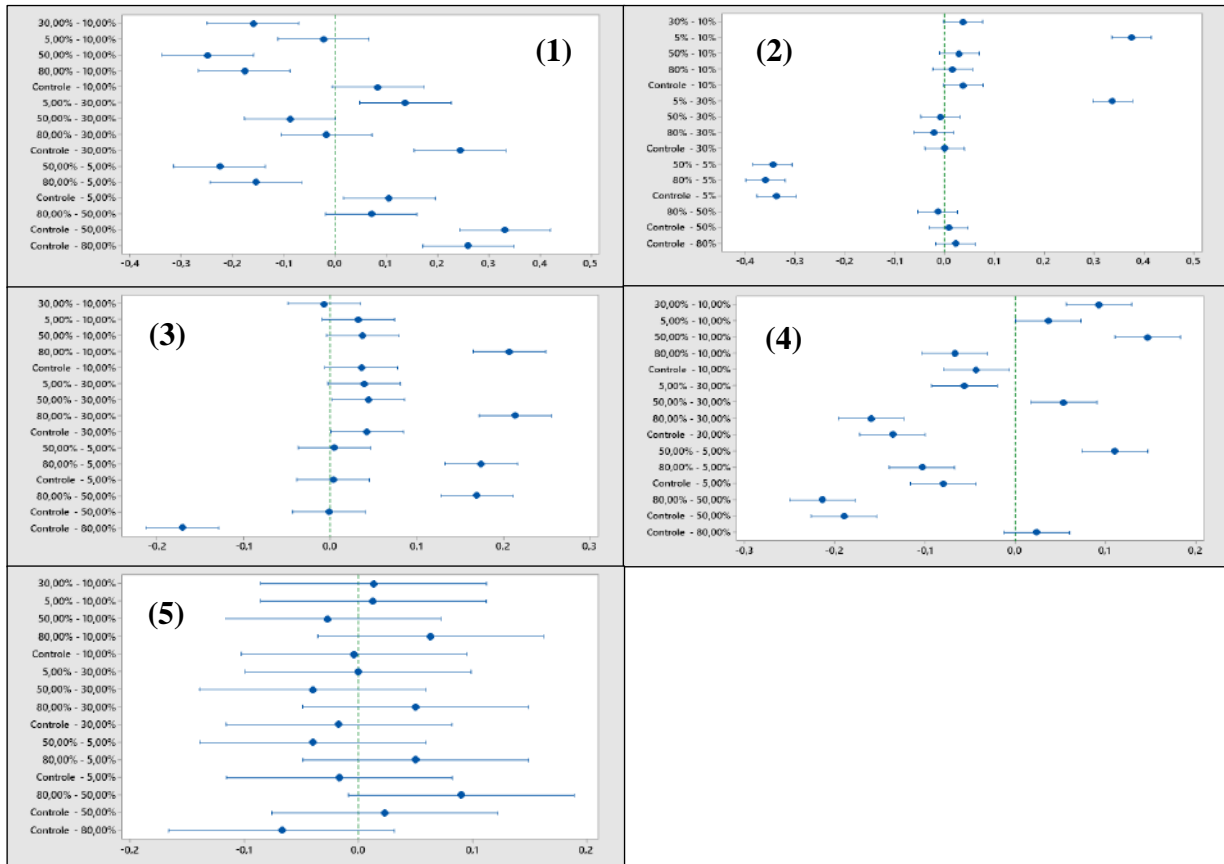
	$F_{\text{calculado}} (\mu_{\text{max}})$	$R^2 (\mu_{\text{max}})$	$F_{\text{calculado}} (t_g)$	$R^2 (t_g)$
<i>Chlorella sp.</i>	45,54	0,9499	24,81	0,9118
<i>Scenedemus acuminatus</i>	299,06	0,9920	84,16	0,9723
<i>Nannochloropsis sp.</i>	79,51	0,9707	61,40	0,9624
<i>Monorapidium contortum</i>	113,88	0,9794	128,94	0,9817
<i>Pediastrum tetras</i>	2,08	0,4647	2,10	0,4647

Fonte: Autores.

Diante disso, pode ser observado nas Figuras 3 e 4, uma abordagem gráfica do tratamento estatístico dos resultados da velocidade máxima de crescimento, através da comparação entre pares de médias. O eixo X representa a diferença entre elas e o eixo Y todas as combinações possíveis entre os meios de cultivo, realizadas através do Teste de Tukey. Para o presente estudo foram observados os seguintes pares: Controle-5%, Controle-10%, Controle-30%, Controle-50% e Controle-80%, tanto com relação a  $\mu_{\text{máx}}$  (Figura 3) como  $t_g$  (Figura 4). Para a *Pediastrum tetras* o valor do  $F_{\text{calculado}}$  foi menor do que o  $F_{\text{tabelado}}$ , constatando-se que a variação na concentração de nutrientes não influenciou estatisticamente os valores médios de  $\mu_{\text{máx}}$  e  $t_g$ , denotando-se que o cultivo de tal espécie nas proporções de esgoto utilizadas não alterou significativamente a cinética de crescimento.

Com relação à  $\mu_{\text{máx}}$ , na *Chlorella sp.* (1) não houve diferença significativa somente entre o *Controle* e o meio 10%, mostrando que a mudança de nível do fator concentração de nutrientes não influenciou estatisticamente no valor deste parâmetro. Todas as demais proporções mostraram diferença significativa, sendo verificado que, no gráfico todos os intervalos estão à direita do zero, indicando que a influência das proporções de nutrientes afetou de maneira a diminuir  $\mu_{\text{máx}}$ . A maior diferença significativa ocorreu entre o Controle e 50%, mostrando que esta proporção de nutrientes foi a que mais contribuiu para a diminuição do valor de  $\mu_{\text{máx}}$ , ratificando os resultados da Figura 2.

**Figura 3:** Teste de Tukey entre as médias da velocidade máxima de crescimento em água de poço e efluentes de fossas sépticas. (1) *Chlorella sp.*, (2) *Scenedesmus acuminatus*, (3) *Nannochloropsis sp.*, (4) *Monoraphidium contortum* e (5) *Pediastrum tetras*.

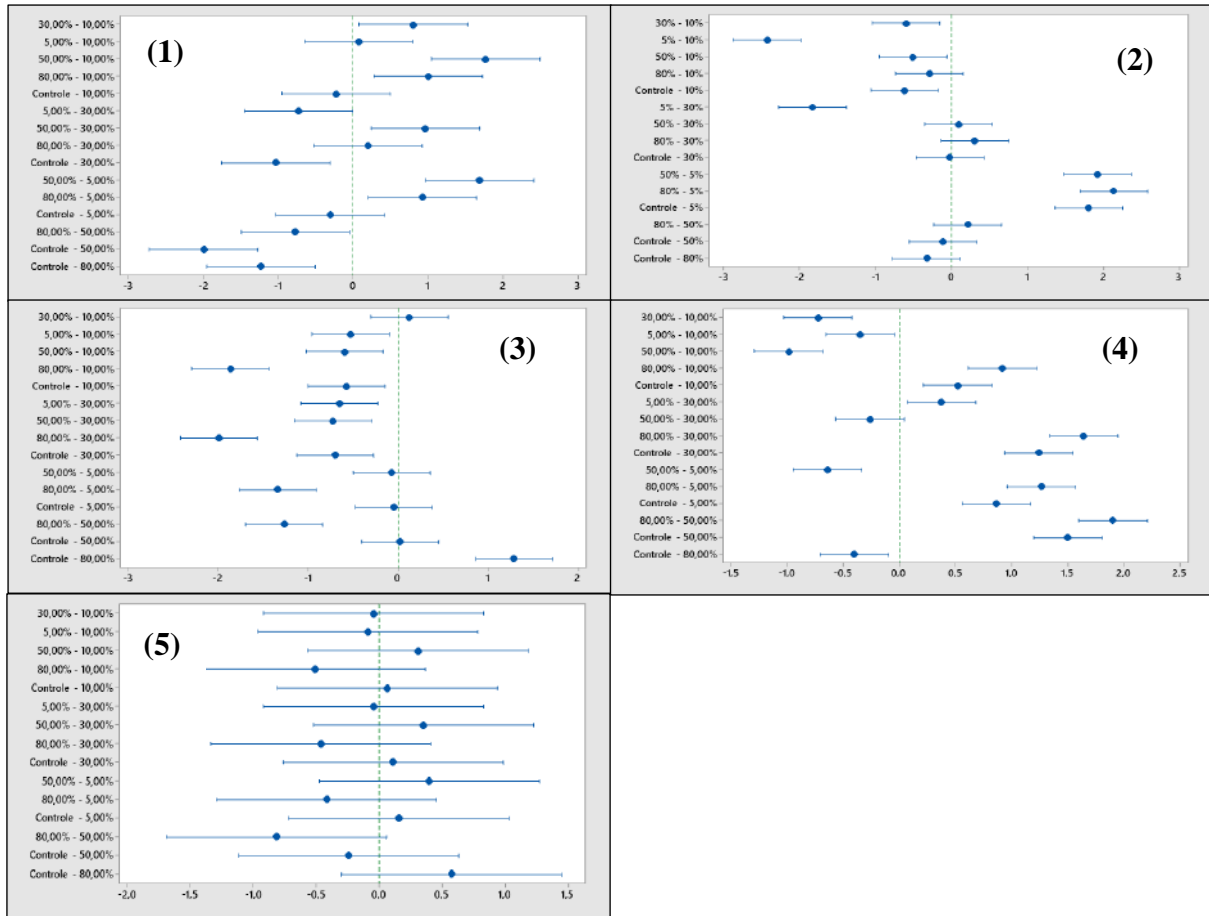


Fonte: Autores.

Com relação à *Scenedesmus acuminatus* (2), diferente da *Chlorella sp.*, só houve diferença entre o *Controle* e a proporção de 5%. Este resultado mostra que somente neste nível há a influência das concentrações de nutrientes no valor de  $\mu_{\max}$ , sendo observado que o intervalo entre o *Controle* e a proporção de 5% está à esquerda do zero, indicando que o efeito das concentrações de nutrientes é positivo na resposta ( $\mu_{\max}$ ), fato confirmado pelo valor de  $\mu_{\max}$  ser o maior para todas as proporções, inclusive do que o *Controle*. Na *Nannochloropsis sp.* (3) houveram diferenças significativas entre os pares *Controle*-30% e *Controle*-80%, estando este último mais afastado do zero à esquerda, o que comprova o efeito positivo da concentração de nutrientes no nível de 80% na varável resposta ( $\mu_{\max}$ ). Isso é ratificado pelo fato da velocidade máxima de crescimento no meio 80% ser a maior entre os cultivos. Os demais níveis (5%, 10% e 50%) não mostraram diferença significativa com o *Controle*.



**Figura 4:** Teste de Tukey entre as médias do tempo de geração nos meios com água de poço e efluente de fossas sépticas (1) *Chlorella sp.*, (2) *Scenedesmus acuminatus*, (3) *Nannochloropsis sp.*, (4) *Monoraphidium contortum*, (5) *Pediastrum tetras*.



Fonte: Autores.

Para a espécie *Monoraphidium contortum* (4) percebe-se que o único par de médias que não apresentou diferença significativa com o *Controle* foi o de 80%. Nos níveis em que esta ocorreu, o aumento nas concentrações de nutrientes contribuiu para o aumento de  $\mu_{\text{máx}}$  já que, os intervalos estão à esquerda do zero. A proporção de 50% foi a que apresentou a maior influência. É importante notar que os resultados do Teste de Tukey são confirmados pelos da Figura 2. Por outro lado, a *Pediastrum tetras* (5) mostrou que em todos os níveis não houve diferença significativa entre as proporções de nutrientes e o *Controle*. Por isso, as concentrações de nutrientes utilizadas não impactaram na cinética de crescimento desta espécie.

Ao analisar a Figura 4 nota-se que, para o tempo de geração, a *Chlorella sp.* (1) apresentou diferença significativa entre o *Controle* e os níveis 30%, 50% e 80%, percebendo-se que a mudança dos níveis provocou o aumento de  $t_g$ . O par Controle-50% está mais afastado do zero, mostrando que nesta proporção ocorreu a maior influência da concentração de nutrientes no aumento de  $t_g$ . Na *Scenedesmus acuminatus* (2) houve diferença significativa entre o Controle e os dois primeiros níveis, sendo a maior entre o Controle e a proporção 5%. No par de médias Controle-10% a concentração de nutrientes provocou o aumento de  $t_g$  em relação ao Controle.

Para a *Nannochloropsis sp.* (3), a diferença aconteceu entre o *Controle* e as proporções 10%, 30% e 80%. Nas duas primeiras o impacto foi negativo, aumentando o tempo de geração. Na de 80%,  $t_g$  diminuiu por interferência das concentrações de nutrientes. A *Monoraphidium contortum* (4) mostrou diferença significativa em todos os meios, com os intervalos à direita

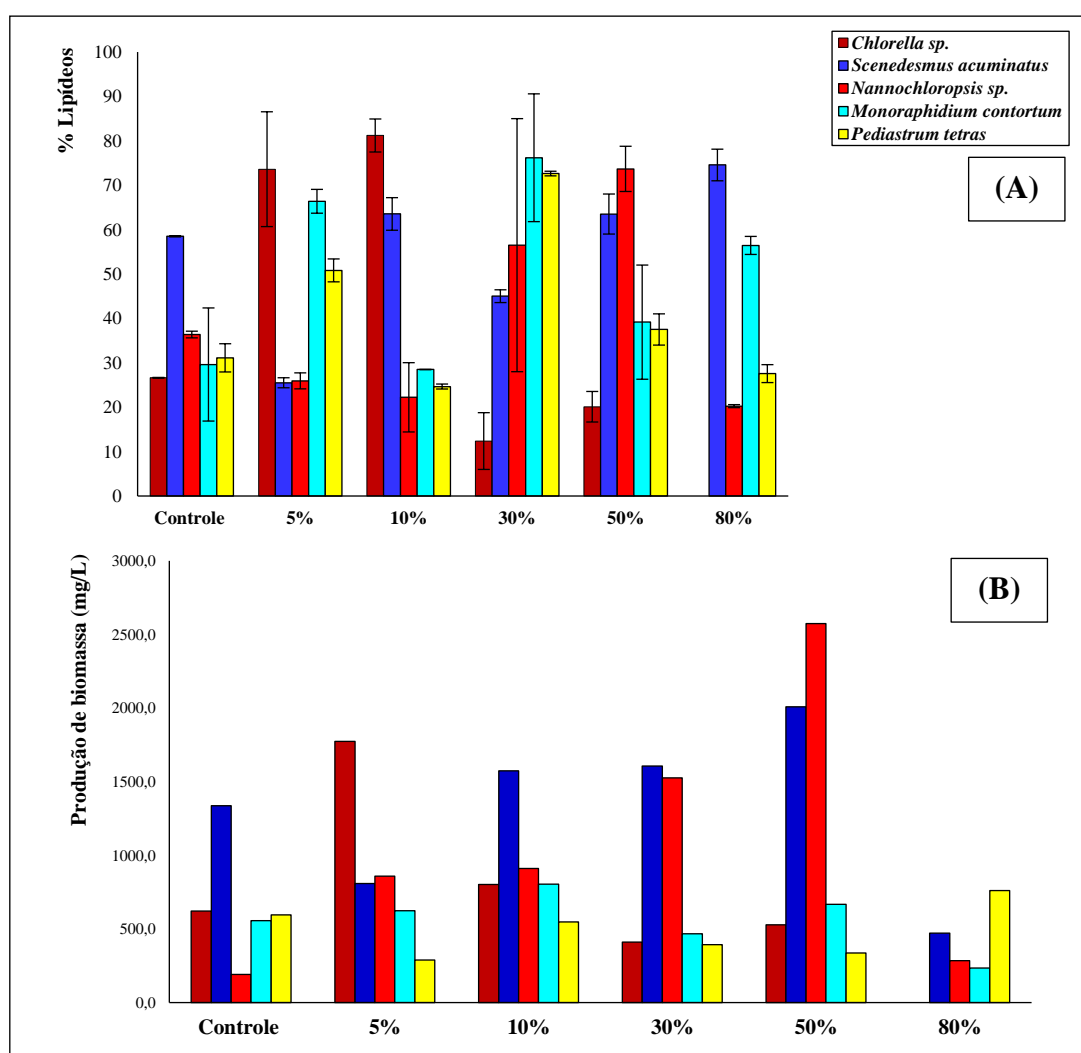
do zero, exceto para a proporção de 80%. Tal fato mostra que as concentrações de nutrientes para todos os níveis tiveram influência no sentido de diminuir o tempo de geração, exceto para o nível de 80% no qual ocorreu aumento de  $t_g$ .

Para a *Pediastrum tetras* (5), não foi observada diferença significativa em nenhum dos níveis com relação ao *Controle*. Estes resultados confirmam que o aumento das concentrações de nutrientes no meio de cultivo não influenciou estatisticamente na variável resposta, sendo confirmado pelos valores de  $t_g$  obtidos, os quais evidenciaram valores próximos para todas as proporções de nutrientes, além do *Controle*. Este resultado indica que o cultivo desta espécie utilizando águas subterrâneas salobras e efluente de fossa séptica como fonte exclusiva de nutrientes não está favorecendo a produção de biomassa, fato que não é interessante para o presente estudo, pois a utilização de tais meios de cultivo visa maximizar a produção de biomassa e de lipídeos aliada com a redução dos custos de produção pela utilização dos meios em questão.

### 3.3 Teor de Lipídeos e Produção de Biomassa

Na Figura 5, o eixo Y representa o teor de lipídeos obtido (A) e a produção de biomassa (B) e o eixo X os meios de cultivo com suas respectivas proporções de nutrientes.

**Figura 5:** Porcentagem de lipídeos (A) e Produção em biomassa seca das espécies estudadas nos meios de cultivo contendo águas residuais domésticas e água de poço (B).



Fonte: Autores.

Para a *Chlorella* sp. os cultivos nas proporções de 5% e 10% apresentaram as maiores porcentagens de lipídeos em biomassa seca. Tais resultados superaram até mesmo o *Controle*, indicando que nos cultivos desta microalga há uma maior produção em meios com maiores quantidades de água salobra e menor proporção de nutrientes. Os melhores resultados para a produção em biomassa seca também ocorreram nos meios 5% e 10%, (1773,51 mg.L<sup>-1</sup> e 801,15 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente), os quais também foram maiores que a produção no *Controle* (621,90 mg.L<sup>-1</sup>). No meio com 80% de proporção de nutrientes não foi obtida biomassa suficiente para quantificação do teor de lipídeos e produção de biomassa.

Já na *Scenedesmus acuminatus* o maior teor de lipídeos foi observado na proporção de 80% (74,54%), superando o *Controle* (58,50%). Porém a produção de biomassa seca para esta proporção de nutrientes não foi satisfatória (471,19 mg.L<sup>-1</sup>) se comparado aos demais meios, principalmente o de 50% (2008,21 mg.L<sup>-1</sup>). Considerando em conjunto os fatores salinidade, concentração de nutrientes e teor de lipídeos, o meio que apresentou os melhores resultados foi a proporção de 50%, o qual apresentou uma porcentagem lipídica de 63,51%, resultado maior que o *Controle*, além de uma alta produção de biomassa seca (2008,21 mg.L<sup>-1</sup>). Tais resultados indicam que meios com salinidades maiores e altas concentrações de nutrientes podem potencializar a acumulação lipídica e aumentar a produção de biomassa para esta espécie.

Em seu trabalho, Han *et al.* 2021 trabalharam com a microalga *Scenedesmus obliquus*, em cultivos fechados, com volume de cultivo de 550 mL, utilizando como meio águas residuais municipais em diferentes estágios de tratamento, estudando a produção lipídica em tais meios nas fases de tratamento primário e secundário. A partir dos cultivos foram obtidos como rendimento lipídico 0,38 g.L<sup>-1</sup> e 0,33 g.L<sup>-1</sup> nestes meios, respectivamente. Os autores destacam que o teor lipídico pode variar, a partir da qualidade do efluente doméstico utilizado. Comparando-se tais resultados com os obtidos no presente trabalho, observa-se que, o percentual lipídico neste estudo superou o dos autores na proporção estudada de 50%, sendo esta a que apresentou a melhor relação produção lipídica versus produção de biomassa por litro de cultivo, tendo o valor de aproximadamente 1,3 g.L<sup>-1</sup>. Tal resultado pode ser justificado pela utilização de águas subterrâneas, de natureza salobra, a qual, por conta da salinidade, pode ser utilizada como artifício para a maximização da produção de lipídeos intracelulares, através do estresse salino, o qual provoca alterações fisiológicas nas células, as quais acarretam uma maior produção lipídica, conforme aborda Pancha, *et al.* (2015).

Tais resultados confirmam a tese levantada neste estudo, sobre a possibilidade de se produzir biocombustíveis a partir da utilização de águas residuárias domésticas como fonte exclusiva de nutrientes em meios salobros, com vistas ao aumento da produção lipídica. A utilização de tal fonte de nutrientes se mostra como um importante fator na redução dos custos de produção, que, de acordo com Mota *et al.* (2022) é um fator que inviabiliza a produção em larga escala, apesar da eficiência fotossintética e alta produtividade de biomassa. Tais custos ainda superam as produções de combustíveis derivados do petróleo e biodiesel de plantas oleaginosas. Os autores ainda destacam que, no ano de 2021 o valor do óleo diesel nos Estados Unidos estava próximo a 1,16 U\$.L<sup>-1</sup>, valor este menor que o óleo produzido a partir de microalgas (U\$ 2,80 U\$.L<sup>-1</sup>). Este fato mostra a importância de estudos que busquem a diminuição destes custos e, no para efluentes urbanos também são uma alternativa de tratamento de diminuição da carga poluidora, trazendo também benefícios ambientais.

Nos cultivos da *Nannochloropsis* sp. os maiores níveis de acumulação lipídica e produção de biomassa ocorreu no meio 50% (73,68% e 2573,80 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Jiang *et al.* (2011), obtiveram 52,40% de acumulação lipídica nesta mesma proporção. Tal fato pode ser atribuído à salinidade do meio, pois os autores utilizaram água do mar, com salinidade mais elevada que as águas subterrâneas salobras utilizadas no presente estudo, fator que pode ter afetado a acumulação lipídica. Além disso, a concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, podem ser fatores preponderantes para o aumento da acumulação lipídica.

Para a *Monoraphidium contortum* os melhores resultados em termos lipídicos ocorreu no meio 30% (76,19%) e a produções de biomassa no de 10% no valor de 623,87 mg.L<sup>-1</sup>. Tais resultados não foram tão satisfatórios, se comparado com os das espécies anteriores. Para a proporção de 80% do efluente de fossa séptica os valores obtidos foram satisfatórios no que diz

respeito à acumulação lipídica (56,44%), porém a produtividade em biomassa caiu consideravelmente (233,75 mg.L<sup>-1</sup>). O mesmo ocorreu com a *Pediastrum tetras*, onde a maior acumulação lipídica ocorreu no meio 30%, (72,63%) e produtividade em biomassa de 392,56 mg.L<sup>-1</sup>. O meio com maior produção foi o de 80%, porém com teor de lipídeos no valor de 27,57%, confirmando a necessidade de equilíbrio lipídeos *versus* produção de biomassa seca. É importante observar que na metodologia utilizada na análise lipídica, tais componentes são extraídos a partir da utilização de solventes orgânicos e banho ultrassônico. Sendo assim, não foi observada a presença de resquícios salinos no conteúdo lipídico, não afetando os percentuais intracelulares obtidos.

### 3.4 Análise Estatística do Teor de Lipídeos

A Tabela 2 mostra que para todos os cultivos há diferença significativa entre todas as espécies estudadas.

**Tabela 2:** Teste F para a % Lipídeos nos cultivos utilizando água de poço e efluente de fossa séptica.  $F_{tabelado} = 3,11$ .

	F <sub>calculated</sub>	R <sup>2</sup>
<i>Chlorella sp.</i>	69,90	0,9635
<i>Scenedemus acuminatus</i>	72,67	0,9838
<i>Nannochloropsis sp.</i>	6,17	0,8371
<i>Monoraphidium contortum</i>	7,10	0,8554
<i>Pediastrum tetras</i>	117,6	0,9899

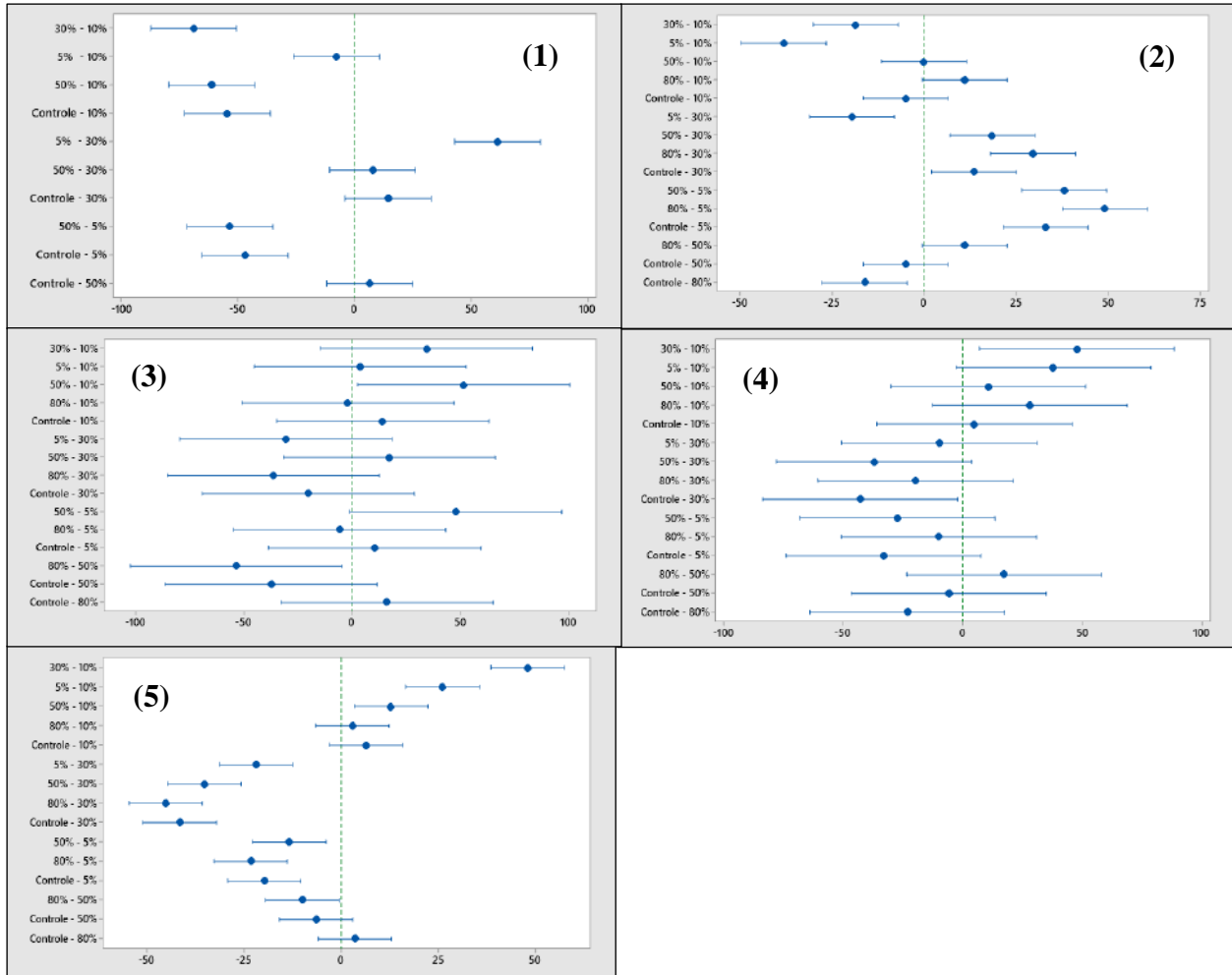
Fonte: Autores.

A partir da Figura 6 pode-se observar que a *Chlorella sp.* (1) só apresentou diferença significativa entre o *Controle* e as proporções de 5% e 10%, sendo a concentração de nutrientes fator que aumentou a acumulação lipídica, fato que ratifica os resultados obtidos na Figura 5. Nas demais proporções não foram encontradas diferenças entre as médias da variável resposta. Na proporção de 80% não foi obtida biomassa suficiente.

Na *Scenedemus acuminatus* (2) houve influência positiva na porcentagem de lipídeos na proporção de 80% (à esquerda do zero), sendo, dentre os meios de cultivo, o que apresentou o maior valor de porcentagem lipídica. Nas proporções de 5% e 30% a concentração de nutrientes implicou na diminuição de lipídeos (intervalo à direita do zero). Para a *Nannochloropsis sp.* (3) não foi observada diferença significativa entre os meios com efluente de fossa séptica e o *Controle*, apontando para o fato de que a maior porcentagem de lipídeos obtida no meio com proporção de 50% foi devido à influência da salinidade do meio. O mesmo foi observado para a espécie *Monoraphidium contortum* (4), em que não houve influência das concentrações de nutrientes e a variável resposta.

Os resultados da *Pediastrum tetras* (5) mostraram que entre o *Controle* e a proporção de 5% houve diferença significativa de maneira a aumentar o teor de lipídeos, já que o intervalo ficou à esquerda do zero. Não foi observada diferença entre os meios 10%, 50% e 80%. Já para a proporção de 30% a influência da concentração de nutrientes foi negativa, diminuindo a acumulação lipídica.

**Figura 6:** Teste de Tukey para % Lipídeos para os cultivos com água de poço e efluente de fossa séptica. *Chlorella sp.*, (2) *Scenedesmus acuminatus*, (3) *Nannochloropsis sp.*, (4) *Monoraphidium contortum*, (5) *Pediastrum tetras*.



Fonte: Autores.

### 3.5 Previsão da Produção de Biomassa em Escala Piloto

A Tabela 3 mostra uma estimativa de produção mensal em escala piloto, a partir da acumulação lipídica máxima obtida nos cultivos das espécies, sendo mostradas as proporções nas quais estes resultados foram máximos. A partir do número de dias de cultivo de cada espécie, são previstos quantos ciclos de cultivo seriam realizados em um mês de produção, bem como são quantificadas a produção de biomassa e lipídeos previstas para cada litro de cultivo. A microalga *Chlorella sp.* obteria sua maior produção de biomassa na proporção de 5% e também sua maior produção lipídica.

Para a *Scenedesmus acuminatus* a maior produção de biomassa seria obtida na proporção de 50% sendo, porém, a maior porcentagem em lipídeos esperada para a de 80%. Como não houve grande discrepância na produção de lipídeos entre as duas proporções o melhor rendimento na produção desta espécie seria obtido no meio 50%, já que a produção de biomassa foi máxima. A *Nannochloropsis sp.* teria uma produção máxima de biomassa e acumulação de lipídeos na proporção de 50%. Nos cultivos das espécies *Monoraphidium contortum* e *Pediastrum tetras* a produção mensal esperada seria menor do que as demais, já que menores produtividades em biomassa seriam esperadas.

Diante disso, na produção em escala piloto é importante observar os dois fatores: acumulação lipídica e produção de biomassa, sendo necessário considerar qual proporção deve ser utilizada no sentido de maximizar estes fatores. Outro fator a ser considerado é a velocidade máxima de crescimento, já que nas produções em larga escala para a produção de biodiesel o tempo

de cultivo é fator preponderante a ser levado em consideração. Observa-se que a *Chlorella* sp. mostrou os melhores níveis de lipídeos nos meios onde a taxa de crescimento máximo foi mais alta, o que confirma a ideia de se cultivar tal microalga em meios com baixa concentração de nutrientes.

Isso não ocorreu com a microalga *Scenedesmus acuminatus* e a *Nannochloropsis* sp., em que os maiores níveis de lipídeos não foram encontrados nos meios com melhor cinética de crescimento. Desse modo, também é importante o equilíbrio entre acumulação lipídica, produção de biomassa e velocidade de crescimento para a escolha da melhor proporção de nutrientes do meio na produção em maiores escalas.

Levando-se em conta que grande parte da água subterrânea encontrada no nordeste brasileiro, principalmente no semiárido, é salobra, esta região pode ser apontada como de grande potencial para a produção de biomassa de microalgas utilizando como fonte exclusiva de nutrientes águas fósicas, um efluente de baixo custo de obtenção, assim como águas salobras de poços da região. Outro aspecto relevante é a possibilidade de utilização da biomassa para produção de biodiesel, haja vista os níveis satisfatórios de lipídeos obtidos com a utilização destes meios de cultivo.

**Tabela 3:** Produção de biomassa prevista em um mês de cultivo.

<i>Chlorella sp.</i>				
	% Lipíds	Ciclos de cultivo/mês	Produção Biomassa/mês (mg/L)	Produção Lipídeos/mês (mg/L)
<i>Controle</i>	26,63	3,0	1865,7	496,84
5%	73,61	3,0	<b>5320,5</b>	<b>3916,42</b>
10%	81,20	3,0	2403,5	1951,64
30%	12,38	3,0	1232,5	152,60
50%	20,11	3,0	1584,4	318,60
<i>Scenedesmus acuminatus</i>				
	% Lipídeos	Ciclos de cultivo/mês	Produtividade Biomassa/mês (mg/L)	Produção Lipídeos/mês (mg/L)
<i>Controle</i>	58,50	1,7	2273,8	1330,17
5%	25,51	1,7	1375,4	350,86
10%	63,53	1,7	2674,1	1698,86
30%	45,01	1,7	2730,0	1228,77
50%	63,51	1,7	<b>3413,9</b>	<b>2168,17</b>
80%	74,56	1,7	801,0	597,23
<i>Nannochloropsis sp.</i>				
	% Lipídeos	Ciclos de cultivo/mês	Produtividade Biomassa/mês (mg/L)	Produção Lipídeos/mês (mg/L)
<i>Controle</i>	36,37	1,8	345,4	125,62
5%	25,94	1,9	1632,6	423,50
10%	22,23	1,8	1640,3	364,64
30%	56,50	1,9	2901,0	1639,07
50%	73,68	1,8	<b>4632,8</b>	<b>3413,45</b>
80%	20,24	1,9	539,5	109,2
<i>Monoraphidium contortum</i>				
	% Lipídeos	Ciclos de cultivo/mês	Produtividade Biomassa/mês (mg/L)	Produção Lipídeos/mês (mg/L)
<i>Controle</i>	29,62	2,1	1168,0	345,96
5%	66,38	2,1	1310,1	<b>869,64</b>
10%	28,49	2,1	<b>1687,6</b>	480,80
30%	76,19	2,1	980,0	746,66
50%	39,16	2,1	1401,1	548,67
80%	56,44	2,1	490,9	277,06
<i>Pediastrum tetras</i>				
	% Lipídeos	Ciclos de cultivo/mês	Biomassa produzida por mês (mg/L)	Produção Lipídeos/mês (mg/L)
<i>Controle</i>	31,12	2,0	1190,0	370,3
5%	50,82	2,1	606,9	308,43
10%	24,66	2,1	1152,4	284,18
30%	72,63	2,1	709,1	<b>515,02</b>
50%	37,51	2,1	723,6	271,42
80%	27,57	2,1	<b>1596,1</b>	440,04

Fonte: Autores.

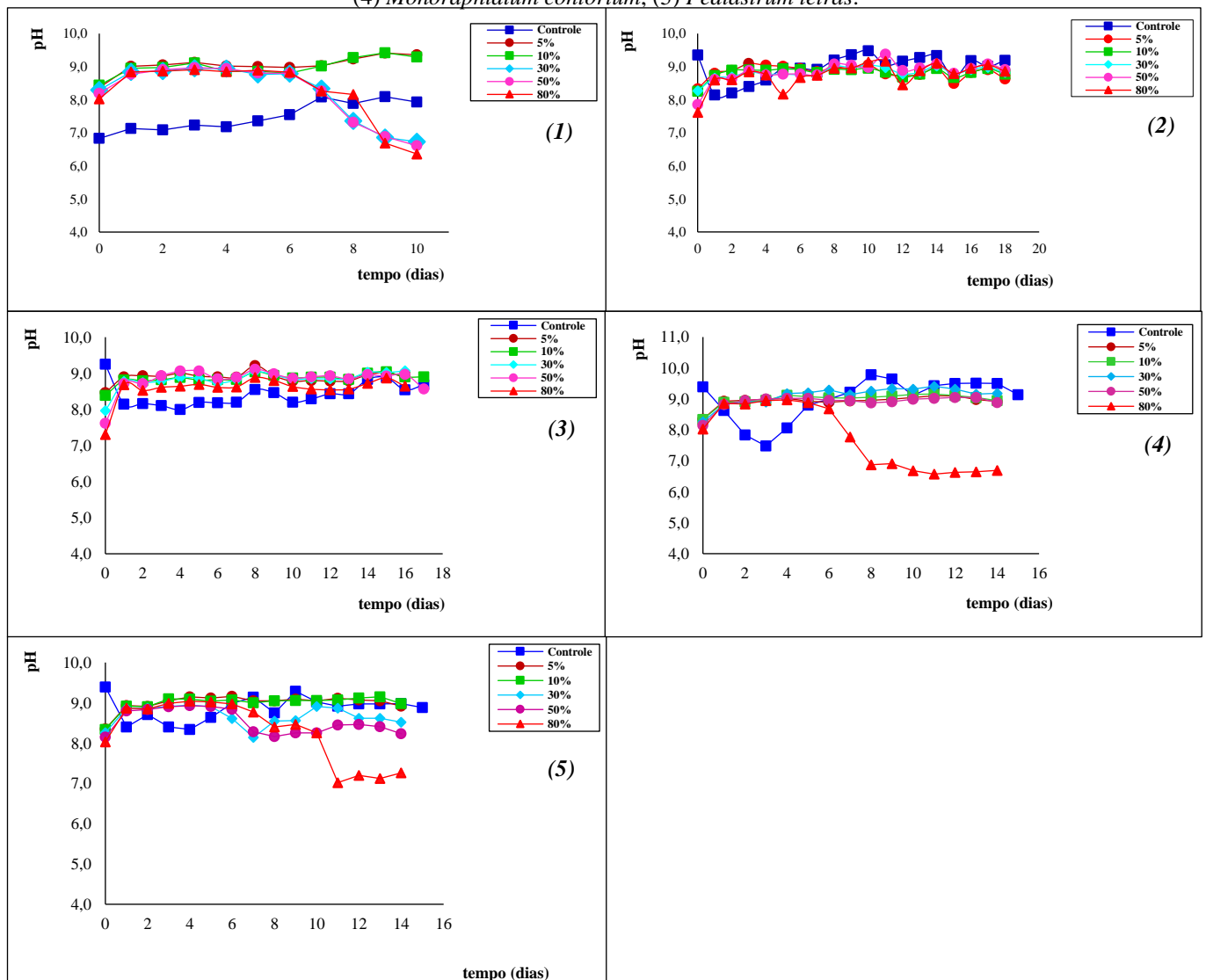
### 3.6 Monitoramento do pH

Pode ser visto na Figura 7 que para todos os meios em todas as espécies o pH, nos primeiros dias de cultivo tem caráter neutro ou levemente alcalino e a tendência é de aumento, ficando o meio com básico ao final dos cultivos. Sharma; Singh; Korstad (2011) afirmam que o CO<sub>2</sub> dissolvido no meio está diretamente relacionado com o pH de forma que, quanto maior a quantidade de carbono inorgânico dissolvido menor será o seu pH. Dahmani *et al.* (2016) ratificam esta informação mencionando que a concentração de CO<sub>2</sub> no meio diminui ao longo do tempo de cultivo devido à realização da fotossíntese, havendo, assim o aumento gradativo do pH.

Nos meios em que a densidade celular foi baixa observa-se que, ao final do cultivo houve uma diminuição do pH, como no caso da microalga *Chlorella sp.*, onde se verificou que nas proporções de 30%, 50% e 80% de nutrientes, por volta do sexto dia de cultivo há uma tendência de diminuição do pH, sendo estes meios os que apresentaram as menores densidades celulares. Pode-se observar tal ocorrência também na proporção de 80% no cultivo da *Monoraphidium contortum* e na de 80% da *Pediastrum tetras*.

**Figura 7:** pH dos meios ao longo do tempo de cultivo para as espécies estudadas com a utilização de água de poço e efluentes de fossas sépticas em diferentes proporções.

(1) *Chlorella sp.*, (2) *Scenedesmus acuminatus*, (3) *Nannochloropsis sp.*,  
(4) *Monoraphidium contortum*, (5) *Pediastrum tetras*.



Fonte: Autores.



#### 4. Conclusão

O estudo encontrou influência da concentração de nutrientes provenientes de águas fósicas na cinética de crescimento, produção de biomassa seca e acumulação de lipídeos em todas as espécies estudadas. Houve aumento da velocidade máxima de crescimento e diminuição do tempo de geração, em relação ao *Controle*, constatando-se que o crescimento se dá mais rapidamente nos meios utilizados do que nos convencionais. As espécies que mostraram os melhores resultados em termos de acumulação lipídica e produção de biomassa, foram a *Chlorella* sp. na proporção de 5% e *Nannochloropsis* sp. na de 50%, revelando o grande potencial de utilização destas espécies para fins bioenergéticos.

As estimativas de produção de biomassa em larga escala mostram o grande potencial para o escalonamento da produção da biomassa de microalgas para a produção em escala piloto e larga escala, utilizando os meios de cultivo estudados e diminuindo dos custos de produção. Desse modo, o estudo constatou estatisticamente a viabilidade de produção de biomassa de microalgas, tendo como meio de cultivo a mistura águas fósicas, como fonte exclusiva de nutrientes, e águas de poços salobras, provocando estresse salino e, a partir desta mistura a produção lipídica pode ser maximizada. O presente trabalho, portanto, comprovou a possibilidade da utilização da biomassa de diferentes espécies de microalgas como uma alternativa viável para a produção de biodiesel, podendo suprir parte da demanda energética atual.

Além disso, com base nos experimentos realizados, resultados obtidos e na produção de biomassa em escala piloto e larga escala previstas ressalta-se a grande multidisciplinaridade que abrange esta área de pesquisa para fins bioenergéticos, havendo a possibilidade de interação de diversas áreas biotecnológicas, seja no estudo da eficiência e produtividade, no controle das variáveis de processo, estudo da cinética de crescimento, nos projetos de biorreatores para os cultivos abertos em larga escala, além da seleção das espécies a serem cultivadas. Sendo assim, pesquisas nessa área se tornam cada vez mais relevantes, uma vez que pode vir a suprir parte da demanda energética, a partir da produção de biocombustíveis, além de possibilitar o reuso de efluentes domésticos como fonte de nutrientes, trazendo benefícios ambientais e redução drástica dos custos de produção.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

#### Referências

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275.
- Bellou, S., Baeshen, M., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Bioresource Technology*, v. 288.
- Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963). *Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Specie*. Austin: University of Texas. (Phycological Studies IV, n. 6318). p. 1-95.
- Carneiro, G. A., Silva, J. J. R., Oliveira, G. A., Pio, F. P. B. *Uso de Microalgas para a Produção de Biodiesel*. (2018). *Research, Society and Development*. v. 7. n. 5. P. 1-12.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., Chang, J. S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 0, p. 1-13.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126-131.
- Dahmani S., Zerrouki, D., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. (2016). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in outdoor open raceway pond using domestic wastewater as medium in arid desert region. *Bioresource Technology*, v. 219, p. 749–752.
- Folch, J., Less, M., Staley, G. H. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-509.
- Guillard, R. R. L., Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide. *Journal Phycology*, v. 8, p. 10-14.
- Han, W., Jin, W., Li, Z., Wei, Y., He, Z., Chen, C., Qin, C., Chen, Y., Tu, R., Zhou, X. Cultivation of microalgae for lipid production using municipal wastewater. (2021). *Process Safety and Environmental Protection*. v. 155. p. 155-165.

- Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., Guo, R. (2011). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3336–3341.
- Kadir, W. N. A., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T. (2018). Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 171, n. May, p. 1416–1429.
- Lee, E., Jalalizadeh, M., Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, v. 12, p. 497-512.
- Mota, G. F., Sousa I. G., Oliveira A. L. B., Cavalcante A. L. G., Moreira, K. S., Cavalcante, F. T. T., Souza, J. E. S., Falcão, I. R. A., Rocha, T. G., Valério, R. B. R., Carvalho, S. C. F., Neto, F. S., Serpa, J. F., Lima, R. K. C., Souza, M. C. M., Santos, J. C. S. (2022). Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. *Algal Research*, v. 62, 102616.
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, v. 189, p. 341-348.
- Qiao, T., Zhao, Y., Zhong, D., Yu, X. (2021). Hydrogen peroxide and salinity stress act synergistically to enhance lipids production in microalga by regulating reactive oxygen species and calcium. *Algal Research*, v. 53, Article 102017.
- Razzak, S. A., Ali, S. A. M., Hossain, M. M., Delasa, H. (2017). Biological CO<sub>2</sub> fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 76, n. September 2015, p. 379–390.
- Salama, E. S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., Jeon, B. H. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 79, n. July 2016, p. 1189–1211.
- Schimidell, W., Borzani, W., Lima, U. A., Aquarone, E. (2001). *Biotechnologia Industrial*, Volume 2. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Blucher. 560 p.
- Sharma, Y. C., Singh, B., Korstad, J. (2011). A critical review on recent methods used for economically viable and eco-friendly development of microalgae as a potential feedstock for synthesis of biodiesel. *Green Chemistry*, v. 13, n. 11, p. 2993–3006.
- Shuba, E. S., Kifle, D. (2018). Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 81, n. April 2016, p. 743-755.
- Srivastava, G., Nishchal, Goud, V. V. (2017). Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR\_047). *Bioresource Technology*, v. 242, p. 244-252.
- Zhang, X., Tang, X., Wang, M., Zhang, W., Zhou, B., Wang, Y. J. (2017). Ros and calcium signaling mediated pathways involved in stress responses of the marine microalgae *Dunaliella salinatio* enhanced UV-B radiation. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, v. 173, p. 360-367.
- Zhang, C., Li, S., Ho, S. (2021). Converting nitrogen and phosphorous wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: A critical review. *Bioresource Technology*. v. 342. 126056.
- Zhao, Y., Song, X., Zhao, P., Li, T., Xu, J., Yu, X. (2021). Role of melatonin in regulation of lipid accumulation, autophagy and salinity-induced oxidative stress in microalga *Monoraphidium* sp. QLY-1. *Algal Research*, v. 54, p. 1-9.
- Zhu, B., Chen, G., Cao, X., Wei, D. (2017). Molecular characterization of CO<sub>2</sub> sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. *Bioresource Technology*, v. 244, p. 1207-1215.