



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

JOSÉ WILLIAM ALVES DA SILVA

**FITORREMEDIÇÃO DE EFLUENTES AQUÍCOLAS E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO
A MICROALGA *Chlorella vulgaris***

**FORTALEZA
2017**

JOSÉ WILLIAM ALVES DA SILVA

**FITORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES AQUÍCOLAS E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO
A MICROALGA *Chlorella vulgaris***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Aquicultura e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Hiran Farias Costa

**FORTALEZA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58f Silva, José William Alves da.
Fitorremediação de efluentes aquícolas e extração de lipídios para a produção de biodiesel utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* / José William Alves da Silva. – 2017.
56 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Hiran Farias Costa.

1. Água. 2. Aquicultura. 3. Biomassa. 4. Nutrientes. I. Título.

CDD 639.2

JOSÉ WILLIAM ALVES DA SILVA

**FITORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES AQUÍCOLAS E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO
A MICROALGA *Chlorella vulgaris***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Aquicultura e Biotecnologia

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Hiran Farias Costa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Glacio Souza Araújo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Aldeney Andrade Soares Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Emanuel Soares dos Santos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais José “Zé Lins” da Silva
Batista e Francisca Zulene Alves Leão, às
minhas irmãs Juliana Alves e Cristiane
Alves, ao meu irmão Adriano Wagner, à
minha esposa Naiane Mascena e ao
amigo e orientador Prof. Wladimir
Ronald Lobo Farias

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Wladimir Farias, pela transmissão de conhecimentos e práticas nesta área de estudo e pelas valiosas sugestões destinadas aos experimentos realizados no laboratório e, sobretudo, para esta tese. A UFC e ao CNPq pelo apoio financeiro e estrutural.

Aos amigos Glácio Araujo, Alan Coêlho, Renato Teixeira, João Bezerra, Jeff Saboya, Júnior Sousa, Huldson Maia, Pahlevi Augusto, Clenio Jario, Roberto Henrique, Jarbas, Jonathan, Natanael. Aos meus colegas da faculdade Rafael Barroso, Michael Akao, Thiago Fonseca, Fábio Martins, Nacélio “Cabrobó”, Fábio Pereira, Ícaro Fernandes, Placido Soares e Paula Naiane.

Aos funcionários do departamento de Engenharia de Pesca Klinger, Gonzaga, Edilson, Omar, Zacarias, Antonio, Afonso, Sidcleyton. Ao professor Aldeney Andrade e ao professor da engenharia química Fabiano Fernandes.

Aos meus amigos Diego, Maxwell, Rafael, Halisson, Antonio Jr, Neto, André, Ricardo, Sandro, Carlos Eduardo, Hermano Farias, Bob, Joly, Ozzy e Igor pelas críticas, sugestões e, acima de tudo, pela amizade.

Aos funcionários do IFCE – Limoeiro do Norte e alunos, Gabriela Maia, Edla Lemos, Adriana Marte, Rafaela Sousa, Hugo Hosternes, Kassio Sombra, Caique, Henrique Maia, Reginaldo e Ivaneide.

Quem disse?

(WRLF, ∞)

RESUMO

A aquicultura depende dos ecossistemas nos quais está inserida e é impossível cultivar organismos aquáticos sem provocar alterações ambientais, porém é possível reduzir significativamente os impactos sobre o meio ambiente. A biorremediação de efluentes utilizando microalgas de alto valor comercial já vem sendo utilizada em escalas menores e está sendo introduzida, gradualmente, em sistemas de cultivos mais complexos. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção para o isolamento de microalgas e utilizá-las na fitorremediação de efluentes aquícolas, bem como na produção de biomassa e extração lipídica. Foram realizados dois tratamentos, com cinco repetições cada, utilizando como meio de cultura efluentes da carcinicultura e piscicultura. O cultivo estacionário foi realizado em um recipiente com volume de 5 L e foi acompanhado, diariamente, por espectrofotometria a 680 nm, sendo a determinação das concentrações de amônia, nitritos, nitratos e fosfatos realizada no início, meio e fim dos cultivos. A separação das células do meio de cultivo foi realizada por floculação química, usando NaOH 2N e, depois de lavada, a biomassa foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por 24 h. Foram analisados o teor lipídico e o perfil dos ácidos graxos por cromatografia. A *Chlorella vulgaris* demonstrou alta eficiência na produção de biomassa e remoção de nutrientes nos dois tratamentos. O rendimento ($12,00 \pm 0,719$ g 100g de alga seca⁻¹) e produtividade lipídica ($0,201 \pm 0,003$ g L⁻¹ dia⁻¹), foram mais elevados ao utilizar o efluente piscícola. A *C. vulgaris* pode ser utilizada da fitorremediação de efluentes aquícolas e na produção de biomassa e lipídios. Em contrapartida o efluente da carcinicultura é o mais indicado para recuperação de biomassa da *C. vulgaris* visando a produção de biodiesel, pois apresenta maior teor de ácido palmítico.

Palavras-chave: Água. Aquicultura. Biomassa. Nutrientes.

ABSTRACT

Aquaculture depends on the ecosystems in which it is inserted and it is impossible to grow aquatic organisms without causing environmental changes, but it is possible to significantly reduce impacts on the environment. The bioremediation of effluents using microalgae of high commercial value has already been used in smaller scales and is being introduced, gradually, in systems of more complex crops. The present study had as objective to carry out a prospection for the isolation of microalgae and to use them in the phytoremediation of aquaculture effluents, as well as in the production of biomass and lipid extraction. Two treatments were carried out, with five replicates each, using as culture medium shrimp and pisciculture effluents. Stationary culture was performed in a 5 L volume and was monitored daily by spectrophotometry at 680 nm. Ammonia, nitrite, nitrate and phosphate concentrations were determined at the beginning, middle and end of the cultures. Separation of the cells from the culture medium was performed by chemical flocculation using NaOH2N, after washing, the biomass was oven dried with air renovation at 60 °C for 24 h. The lipid content and the fatty acid profile were analyzed by chromatography. *Chlorella vulgaris* demonstrated high efficiency in biomass production and nutrient removal in both treatments. The yield (12.00 ± 0.719 g 100 g DW⁻¹) and lipid yield (0.201 ± 0.003 g L⁻¹ day⁻¹) were higher when using the fish effluent. *C. vulgaris* can be used for the phytoremediation of aquatic effluents and for the production of biomass and lipids. In contrast, the effluent from shrimp farming is the most suitable for recovery of *C. vulgaris* biomass for the production of biodiesel, since it has a higher content of palmitic acid

Keywords: Water. Aquaculture. Biomass. Nutrients.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação de algumas fontes de biodiesel	23
Tabela 2	Composição dos efluentes da aquicultura utilizados como meio de cultura	27
Tabela 3	Médias e desvio padrão de rendimento cinético e lipídico dos cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> em efluente de e piscicultura e carcinicultura.	41
Tabela 4	Porcentagem de ácidos graxos presentes no óleo obtido de <i>C. vulgaris</i> cultivada em efluentes aquícolas e comparação com outros perfis de ácidos graxos	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Descarte do efluente durante a despesca do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
Figura 2	Microalgas dos gêneros: A) <i>Spirulina</i> e B) <i>Chlorella</i>	20
Figura 3	Transportes movidos à biocombustível a partir de microalgas A) Ônibus fabricado pela Isuzu Motor e Euglena Company; B) Toyota Prius; C) Primeiro voo de passageiros da Lufthansa com biocombustível; D) Primeiro voo com 100% combustível oriundo de algas.	25
Figura 4	Fluxograma do método de extração lipídica Bligh; Dyer (1959)	30
Figura 5	Açude Castanhão, Jaguaribara (Ceará, Brasil), evidenciando os pontos de coleta.	33
Figura 6	<i>Alacouseira</i> sp. (A), <i>Chlorella vulgaris</i> (B) e <i>Staurastru chaetoceras</i> (C)	34
Figura 7	Curvas de crescimento da <i>C. vulgaris</i> com efluentes aquícolas.	35
Figura 8	Curva de crescimento típica de uma população de microalgas expressa em densidade celular por dia de cultivo.	36
Figura 9	Curvas de crescimento e de remoção de nutrientes nos cultivos de <i>C. vulgaris</i> com efluente de piscicultura (A) e carcinicultura (B).	38
Figura 10	Célula da <i>C. vulgaris</i> sem membrana após sonicação (A) e célula com membrana celular intacta (B).	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Aquicultura e Efluentes	16
2.2	Microalgas	18
2.3	Fitorremediação	21
2.4	Recuperação de biomassa algal e potencial lipídico para biodiesel.....	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Bioprospecção das microalgas	26
3.2	Isolamento.....	26
3.3	Cultivo das microalgas com efluentes aquícolas	26
3.4	Correlação entre densidade óptica (DO_{680nm}) e peso seco (PS).....	28
3.5	Parâmetros de rendimento cinético e lipídico	28
3.6	Recuperação total da biomassa algal.....	29
3.7	Extração e rendimento lipídico	29
3.8	Caracterização dos lipídios extraídos das microalgas	31
3.9	Análises estatísticas.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A produção aquícola mundial de crustáceos, moluscos e peixes precisa aumentar para satisfazer a demanda crescente (GJEDREM; ROBINSON; RYE, 2012) e também para compensar a redução de captura da pesca, pois algumas espécies já se encontram sobre exploradas (GOU; ZOU, 2015). Para aumentar esta produção é necessário estimular o crescimento sustentável da aquicultura em grandes corpos hídricos, aumentando a área de produção em reservatórios onde já existem polos aquícolas e reaproveitando a água de cultivos em tanques e viveiros (KUBTIZA, 2011).

Com uma vasta hidrografia o Estado do Ceará tornou-se um grande produtor de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e do camarão marinho *Penaeus vannamei* adaptados para cultivos em águas oligohalinas. São culturas de grande impacto na economia do Estado, gerando emprego e renda nas regiões onde são realizadas. Porém, a geração de efluentes destes setores pode causar grandes impactos ambientais, desde o descarte de água contaminada até o aparecimento de doenças (TSUKUDA *et al.*, 2015).

A aquicultura depende dos ecossistemas nos quais está inserida e é impossível cultivar organismos aquáticos sem provocar alterações ambientais, porém é possível reduzir significativamente os impactos sobre o meio ambiente (CHEN *et al.*, 2015). Esta abordagem deve fazer parte do processo produtivo, uma vez que não podem ser desenvolvidas tecnologias visando aumentar apenas a produtividade dos cultivos sem avaliar os impactos ambientais decorrentes da atividade (DAVID *et al.*, 2015).

A geração e descarga de elevadas quantidades de efluentes com alto potencial poluidor, compostos por restos de ração não consumida e excretas metabólicas, aumentaram com o desenvolvimento da aquicultura mundial que, devido à demanda crescente, teve um rápido desenvolvimento nas últimas décadas, ocasionando um significativo aumento dos impactos negativos no ambiente (BUHMANN; PAPENBROCK, 2013). Em acordo com estas afirmações, Herbeck *et al.*, (2014) observaram que o processo de produção de organismos aquáticos gera quantidades significativas de efluentes contaminados e que, as descargas da aquicultura para os corpos hídricos levam muita matéria orgânica, resultando no aumento da concentração de nutrientes orgânicos e inorgânicos, como a amônia, fósforo e carbono.

A eutrofização das águas costeiras e continentais causada por atividades antrópicas tornou-se um problema comum em muitos países. Este processo contribui para um aumento na produtividade primária e frequentemente gera alterações indesejáveis na estrutura e na função

dos ecossistemas aquáticos. Nas últimas décadas, a eutrofização causada pela aquicultura intensiva tornou-se uma preocupação constante para os produtores e agências de controle ambiental, devido à grande quantidade de resíduos produzidos por essa atividade (MARINHO-SORIANO *et al.* 2011), por isso é necessário o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo mais sustentáveis na aquicultura para diminuir os impactos negativos da atividade. Uma das alternativas é a fitorremediação que utiliza vegetais aquáticos para assimilar os nutrientes produzidos pelo cultivo de animais aquáticos (SILVA, 2013).

Em viveiros de aquicultura, uma grande fração dos nutrientes provenientes da ração encontra-se no sedimento e nos efluentes ao final do cultivo, enquanto apenas uma pequena parte vai fazer parte da composição corporal dos organismos cultivados (FARMAKI *et al.*, 2014). Na realidade, a maior fração dos nutrientes deveria fazer parte do pescado, aumentando a produtividade e diminuindo a quantidade destes componentes nos corpos receptores, corroborando para o respeito social, econômico e sustentabilidade ambiental (BOSMA; VERDEGEM, 2011).

A biorremediação de efluentes utilizando microalgas de alto valor comercial já vem sendo utilizada em escalas menores e está sendo introduzida, gradualmente, em sistemas de cultivos mais complexos (ARITA; PEEBLES; BRADLEY, 2015). Nedbal *et al.*, (2008), afirmam que cultivos de organismos aquáticos com altas taxas de alimentação geram elevadas cargas de nutrientes suficientes para manter o crescimento algal que, por sua vez, remove os nutrientes e captura o CO₂.

As microalgas são bastante utilizadas na aquicultura como alimento para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos em decorrência da facilidade de cultivo, ao pequeno tamanho, acentuada velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos polinsaturados (SUH *et al.*, 2015).

Algumas espécies de microalgas são fontes promissoras para produção de biodiesel em larga escala (MOHAN *et al.*, 2015), com produtividade maior que outras oleaginosas vegetais (GAO *et al.*, 2010), sendo uma solução viável do ponto de vista econômico e ambiental como uma excelente alternativa aos combustíveis fósseis (SYDNEY *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2011). Além disso, sua produção não compete com o plantio de alimentos, pois as microalgas podem ser cultivadas em regiões não agricultáveis (SUBHADRA; EDWARDS, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção para o isolamento de microalgas e utilizá-las na fitorremediação de efluentes aquícolas, bem como na produção de biomassa e extração lipídica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura e Efluentes

Dados sobre a produção de organismos aquáticos da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2010) demonstram que em 2020 mais de 50% da produção de pescado deverá ser proveniente da aquicultura devido ao grande crescimento da população humana, ao crescente aumento da demanda por organismos aquáticos e ao declínio ou estagnação do setor pesqueiro. Com isso, em muitos países, a aquicultura intensiva vem sendo uma opção para suprir a elevada e crescente demanda por organismos aquáticos (ERTOR; ORTEGA-CERDA, 2015). Atualmente a aquicultura representa 44% da produção mundial de pescado (FAO, 2016).

A piscicultura e a carcinicultura despontam como atividades bastante rentáveis na aquicultura mundial. O Brasil produziu mais de 239 mil toneladas de tilápia em 2016 (BRASIL, 2016), sendo os produtores familiares responsáveis por grande parte desse resultado (BRASIL, 2013). No Nordeste brasileiro, a tilápia do Nilo e o camarão *Litopenaeus vannamei* são as principais espécies produzidas (KUBITZA, 2011; TEIXEIRA-LOPES *et al.*, 2011).

Apesar dos benefícios advindos da aquicultura, como a elevada produção de carne rica em proteínas (GONÇALVES, 2011), esta atividade precisa ser conduzida com bastante responsabilidade, reduzindo os conflitos sociais causados pelo uso de recursos comuns e minimizando os danos ao meio ambiente (ALEXANDER *et al.*, 2015). Os impactos ambientais negativos são empecilhos para a expansão desta atividade como a criação de novos parques aquícolas em âmbito mundial, gerando declínios na produção e perspectivas de retração do setor nos próximos anos, caso continuem as agressões aos ecossistemas (McDONOUGH *et al.*, 2014).

A aquicultura depende diretamente da boa qualidade da água para sua expansão, por isso a contaminação dos corpos hídricos pelas próprias fazendas de cultivo pode provocar o “suicídio” da atividade (KARIMANZIRA *et al.*, 2014). Dessa forma, para evitar problemas na produção de peixes e crustáceos, a aquicultura sustentável surge como uma ferramenta imprescindível para manter a atividade em crescimento.

A aquicultura sustentável, ambiental e socialmente justa gera emprego e renda para as baixas classes sociais, interligando os produtores familiares à realidade do mercado econômico (MUNGKUNG *et al.*, 2013). Pant *et al.* (2014) associam a aquicultura e a sustentabilidade em

um modelo desejável de produção de organismos aquáticos sem impactar o meio ambiente, com lucro e benefícios sociais.

Diariamente na produção, os aquicultores se deparam com diversos obstáculos para manter a qualidade de água, a sanidade e uma boa gestão em seus empreendimentos. Isto ocorre devido aos, principalmente, seguintes fatores: a) desconhecimento dos conceitos básicos que impactam o bem-estar e a saúde dos peixes; b) as condições precárias das instalações e equipamentos; c) o desconhecimento das soluções tecnológicas disponíveis para a melhoria dos cultivos; d) a mão de obra pouco capacitada em boas práticas de manejo; e) a ausência de planejamento e de cultura de controle e gestão da produção e custo. Esses cinco aspectos influenciam diretamente no sucesso e na sustentabilidade dos empreendimentos aquícolas (KUBTIZA, 2011).

Os efluentes aquícolas possuem elevadas concentrações de compostos nitrogenados, como a amônia, bastante tóxica para grande parte dos seres vivos, sendo acumulada nas águas que recebem os efluentes da aquicultura intensiva (RAY; TERLIZZI; KANGAS, 2015; CASTELLANI; CAMARGO; ABOMORAD, 2009). Grande parte dos projetos de aquicultura, não possui uma disposição adequada de seus efluentes, sendo apenas realizado um monitoramento dos mesmos, antes de lançá-los nos corpos hídricos receptores (JERONIMO; BALBINO, 2012).

Os efluentes podem gerar o processo de eutrofização, que pode ser trazer pontos positivos ou negativos ao ambiente e/ou em empreendimentos aquícolas. Em ambientes pobres em nutrientes a eutrofização pode elevar a produtividade primária e suprir a base trófica de um determinado habitat, já em empreendimentos aquícolas a eutrofização é essencial, como em cultivos de algas para a elevada produção máxima de biomassa (SILVA, 2013).

O descarte e acúmulo de grandes quantidades de nutrientes nitrogenados e fosfatados oriundos da matéria orgânica presente nas sobras de ração e excretas dos organismos no ambiente aquático (Figura 1), frequentemente, promove o aumento da produtividade primária, podendo causar eutrofização, hipoxia ou até anoxia em águas de pouca movimentação, resultando na eventual morte dos organismos aquáticos. Desta forma, é necessário que haja uma maior atenção na solução destes problemas (WILKIE *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2013).

Figura 1. Descarte do efluente durante a despesca do camarão *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: Associação Brasileira de Criadores de Camarão - ABCC

As práticas utilizadas atualmente para tratamento de águas de esgotos domésticos não são aplicáveis aos efluentes da aquicultura intensiva, pois são de custo muito elevado, onerando a receita final dos produtores, inviabilizando tal procedimento.

Visando reduzir problemas com o lançamento de efluentes aquícolas no ambiente, o tratamento destes com microalgas é uma opção bastante eficiente e viável, já que estes microrganismos utilizam como nutrientes substâncias inorgânicas, compostos nitrogenados e fosfatados (LANANAN *et al.*, 2014), que são prejudiciais aos cultivos de animais aquáticos e potencialmente danosos ao meio ambiente. Por outro lado, a biomassa algal produzida pode ainda ser utilizada em diversas aplicações (SHIN *et al.*, 2015).

2.2 Microalgas

São organismos unicelulares, filamentosos ou coloniais que podem apresentar estrutura celular procariótica ou eucariótica (BASHAN; BASHAN, 2010). Compõem o grupo das procarióticas as Cyanophyta (algas azuis) e Prochlorophyta. Já as eucarióticas pertencem principalmente às classes Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos), Cryptophyceae (criptomônadas), Prasinophyceae e Chlorophyceae (algas verdes) (BICUDO; MENEZES, 2006). Estes organismos são de extrema importância para a produtividade primária dos oceanos e corpos hídricos continentais, bem como na fixação do CO₂ (CHISTI, 2007) e produção de oxigênio (BERBEROGLU; GOMEZ; PILON, 2009).

Há evidências da existência de microalgas desde o período pré-cambriano, aproximadamente há 3,5 bilhões de anos. Estes microrganismos, principalmente as espécies marinhas, são responsáveis pela produção e manutenção do O₂ atmosférico (TAHMASEBI *et al.*, 2013). As algas formam a base da cadeia alimentar, sendo responsáveis por manter o equilíbrio ecológico, além da importância econômica e social por suportar a fauna, que é fonte de alimento para humanos (GAFFNEY; O'ROURKE; MURPHY, 2014) e demais organismos (EL-SAYED *et al.*, 2014).

As algas, objetos de estudo da ficologia, estão na base da cadeia alimentar, devido à sua capacidade de produzir compostos orgânicos essenciais a partir de água, nutrientes e luz solar (SILVA *et al.*, 2015). A composição algal varia de acordo com as condições ambientais, existindo espécies ricas em proteínas, polissacarídeos, pigmentos e ácidos graxos (GEORGE *et al.*, 2014).

Microalgas contêm cerca de 50% de carbono em sua biomassa que é obtido na maioria dos casos a partir de dióxido de carbono atmosférico e, portanto, estão atraindo o interesse para o sequestro de carbono em processos industriais (BILLER; ROSS, 2014; RAEESOSSADATI *et al.*, 2014). Compostos nitrogenados e fosfatados são nutrientes essenciais para as microalgas formarem suas proteínas e membranas celulares, com isto, esses organismos removem elevadas quantidades destes compostos dos corpos hídricos, mitigando seus impactos negativos (CHANG; DUAN; XU, 2015).

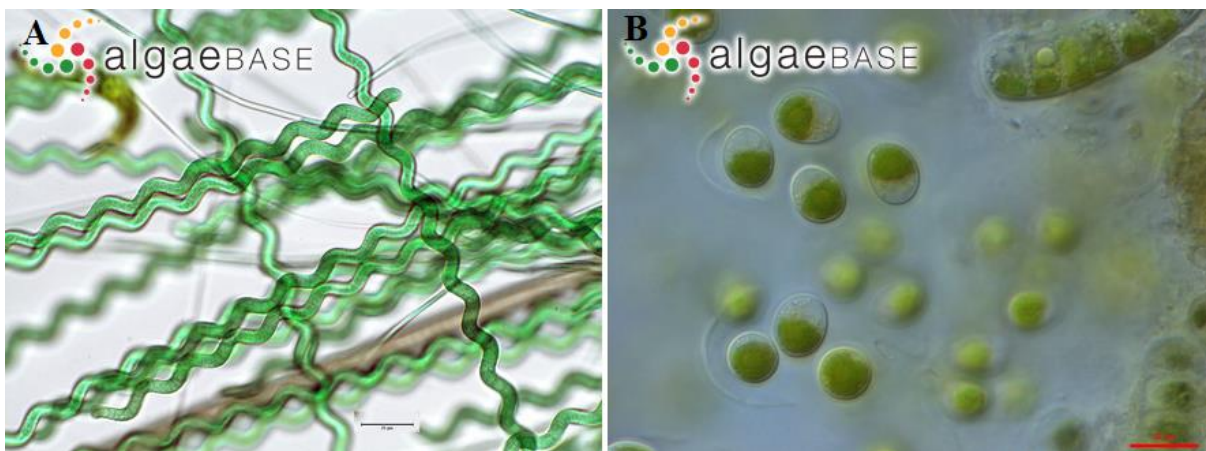
O cultivo de algas em grande escala teve início em 1960 no Japão com a cultura de *Chlorella*, enquanto a coleta de *Spirulina* começou no México a partir de 1970. A comercialização de algas também ocorreu na Austrália, com o crescimento dos cultivos de *Dunaliella salina* para produção de *b*-caroteno. Consequentemente, cultivos também surgiram nos Estados Unidos da América (EUA) e Israel, sendo a produção de algas azul-verdes também realizada na Índia (BOROWITZKA, 2006).

Ultimamente, as microalgas têm despertado a atenção de pesquisadores em todo o mundo devido suas características especiais e possível utilização em escalas comercial e industrial (MILLEDGE, 2011). A produção de microalgas em diversos setores gera benefícios sociais, ambientais e econômicos. Plantas de cultivo construídas nos EUA e na Índia produzem *Haematococcus pluvialis* para a extração de astaxantina, utilizada como corante alimentar e também como um poderoso anti-oxidante na indústria de fármacos e cosméticos (NAGARAJ *et al.*, 2012).

As microalgas são bastante utilizadas na aquicultura como alimento para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos em decorrência da facilidade de cultivo, ao pequeno tamanho, acentuada velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos polinsaturados (DERNER *et al.*, 2006). A adição de microalgas, vivas ou congeladas, na alimentação destes indivíduos possibilita um maior crescimento e melhor qualidade nutricional agregando valor e aumentando a viabilidade dos empreendimentos (RYCKEBOSCH, *et al.*, 2014; JU; DENG; DOMINY, 2012).

A alimentação humana também pode ser suplementada pelas microalgas e diversos produtos comerciais já estão disponíveis, principalmente dos gêneros *Spirulina* e *Chlorella* (Figura 2), ricas em proteínas e ácidos graxos essenciais. Também são utilizadas na indústria farmacêutica (WANG *et al.*, 2010), no tratamento de efluentes (RAEESOSSADATIA *et al.*, 2014) e ainda na produção de biocombustíveis (SHIN *et al.*, 2015). As algas também acumulam grandes quantidades de óleo, principalmente triglicerídios, que podem ser extraídos e convertidos por processos químicos em biodiesel (URI; TATYANA; MEIRA, 2010).

Figura 2: Microalgas dos gêneros: A) *Spirulina* e B) *Chlorella*



Fonte: AlgaeBASE

A produção de microalgas em larga escala apresenta algumas dificuldades como, por exemplo, o uso de nutrientes inorgânicos, necessidade de um grande volume de água e a dificuldade de separação das células de menores tamanhos (0,5-30 μm) do meio de cultivo líquido (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Uma possível solução para superar o alto custo de produção das microalgas é a substituição da água potável por água do mar ou por águas residuárias de origem rural, urbana, industrial ou da aquicultura, que são ricas em nutrientes

(CHO *et al.*, 2011), bem como utilizar gases de combustão de indústrias e termoelétricas como fonte de CO₂ para acelerar a fotossíntese (MORAIS; COSTA, 2007).

2.3 Fitorremediação

A utilização das microalgas no tratamento de efluentes remove os compostos nitrogenados e fosfatados que podem causar eutrofização nos corpos hídricos receptores (RUIZ-MARTINEZ *et al.*, 2012). Além disso, são capazes também de remover metais pesados, incorporando-os na parede celular (RICHARDS; MULLINS, 2013) e alguns compostos orgânicos tóxicos como fenóis e clorofenóis (CHIAIESE *et al.*, 2011).

Estudos como os de Li *et al.* (2011), Kobayashi *et al.*, (2013) e Li *et al.* (2013a) relatam uma desaceleração da taxa de crescimento diário em cultivos de *Chlorella* sp., à medida que ocorre o consumo dos nutrientes, principalmente nitratos e fosfatos, que são essenciais para o crescimento das algas.

O acompanhamento do consumo de nutrientes em cultivos de microalgas pode ser realizado pela determinação da concentração destes no meio de cultivo (GUERRERO-CABRERA *et al.*, 2014). Silva (2013) relatou que a microalga *Chlorella vulgaris* foi capaz de remover 94,44% dos nitritos em um efluente da carcinicultura, enquanto Samori *et al.* (2013) mostraram que a microalga *Desmodesmus communis* reduziu quase 100% deste nutriente de um efluente de estação de tratamento urbano, em apenas três dias de cultivo. A remoção de nutrientes também varia de acordo com a espécie utilizada, porque cada uma possui características biológicas específicas (CAI; PARK; LI, 2013).

Bertoldi *et al.* (2007) avaliaram o consumo de nitrato em diferentes diluições de uma solução hidropônica residual, utilizando a microalga *C. vulgaris*. Os autores constataram que no cultivo realizado com 25% da quantidade de nitrato da solução original as microalgas removeram 87% desse composto do meio de cultivo, enquanto nos cultivos realizados com a solução original e com 50% da concentração de nitrato, as microalgas consumiram, respectivamente, 80,5 e 80,4% do nitrato presente no meio.

A microalga *Chlorella vulgaris* diminuiu acentuadamente a concentração de nitrato de um efluente de uma estação de tratamento de água em apenas nove dias, passando de $7,6 \pm 0,24$ para $3,4 \pm 0,17$ mg L⁻¹, demonstrando seu alto potencial para remoção de compostos

nitrogenados de águas residuárias, semelhante ao observado em efluentes aquícolas (KIM *et al.*, 2010).

Kumar, Miao e Wyatt (2010) utilizaram a microalga *C. vulgaris* para retirar a amônia total de um efluente de suinocultura. Segundo os autores, a concentração de amônia total foi reduzida em 54% em seis dias e, após dez dias de cultivo, a remoção foi superior a 85%, demonstrando que as microalgas, podem ser utilizadas em bacias de decantação para remoção de amônia.

Charity *et al.*, (2009) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em um efluente de piscicultura e observaram uma redução de 94,44% na amônia total. Os cultivos foram realizados em tanques externos de 150 L expostos as condições ambientais naturais e providos de aeração constante, caracterizando a eficiência das microalgas na remoção de compostos nitrogenados.

Li *et al.*, (2013a) avaliaram a remoção de nutrientes em um efluente de fermentação rico em ácido cítrico pela microalga *C. vulgaris* e constataram uma remoção de 47,6 e 10,4% para amônia e fósforo, respectivamente. Os mesmos autores, em outro estudo utilizando efluente de uma estação de tratamento municipal, observaram a alta eficiência fitorremediadora de *C. vulgaris*, removendo 98% da amônia e 90% do fósforo (LI *et al.*, 2013b). Em ambos os estudos a *C. vulgaris* removeu amônia e fósforo, mas dependendo do tipo de efluente, a remoção pode apresentar valores diferenciados, pois depende da composição do meio e do crescimento celular.

Woertz *et al.*, (2009) utilizaram um efluente urbano com diluição de 10 e 25% em um cultivo misto de clorofíceas e diatomáceas. Em quinze dias de experimento, as microalgas removeram mais de 96% de amônia e 99% de fosfato em ambas as diluições do efluente.

Feng; Li e Zhang (2011) observaram uma remoção de 97% na amônia e de 96% no fósforo no cultivo de *C. vulgaris*, utilizando água residual artificial como meio de cultivo. A grande eficiência na remoção de compostos nitrogenados e fosfatados torna esta espécie bastante promissora para o tratamento de efluentes. Li *et al.* (2011) mostraram que após 14 dias de cultivo da microalga *Chlorella* sp. em efluente urbano, a mesma foi capaz de remover 93,9 e 89,1% do nitrogênio amoniacal e fósforo totais, respectivamente.

O uso de algas nativas, após isolamento e identificação, na fitorremediação de efluentes aquícolas é muito importante porque já são algas resistentes e bem adaptadas às condições naturais facilitando o cultivo destas espécies, principalmente em larga escala (SILVA, 2013).

2.4 Recuperação de biomassa algal e potencial lipídico para biodiesel

Algumas espécies de microalgas podem produzir elevadas quantidade de biomassa e acumular grandes concentrações de lipídios, que podem ser utilizados em diversas aplicações nos setores industrial, alimentício, de saúde e energético (LEE; HAN, 2015). Além destas utilidades, as microalgas podem consumir o dióxido de carbono, uns dos gases responsáveis pelo efeito estufa. As microalgas necessitam apenas de luz solar e nutrientes para se desenvolverem e podem ser cultivadas em áreas não agricultáveis, utilizando água salobra ou água do mar (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

A produção de biomassa e lipídios está diretamente relacionada com a espécie cultivada e as condições ambientais que as culturas são submetidas (DRAGONE *et al.*, 2011). Dentre os nutrientes mais importantes no incremento de biomassa e produção lipídica, o nitrogênio assume um papel importante, pois seu excesso ou deficiência no meio de cultura interfere na composição das microalgas (De La HOZ *et al.*, 2011).

Diversos tipos de efluentes são utilizados para produzir biomassa algal e óleo (EL-KASSAS; MOHAMED, 2014). Culturas realizadas com efluentes aquícolas apresentam produtividades de óleo mais elevadas que outras oleaginosas usadas como fonte para a produção de biodiesel (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação de algumas fontes de biodiesel.

Fonte	Rendimento de óleo (L ha ⁻¹)
Milho	172
Soja	446
Canola	1.190
Piã Manso	1.892
Coco	2.689
Óleo de Palma	5.950
Microalga ^a	58.700
Microalga ^b	136.900
<i>C. vulgaris</i> Carcinicultura ⁺	16.655
<i>C. vulgaris</i> Piscicultura ⁺	83.333

^a 30% de óleo do total de peso seco; ^b70% de óleo do total de peso seco;

⁺ Cultivo da *C. vulgaris* em efluentes aquícolas (SILVA, 2013);

Fonte: Modificado de Chisti (2007).

Alterações no meio de cultura podem ser consideradas excelentes estratégias para o incremento lipídico em *C. vulgaris*, uma vez que a microalga sob estresse, possivelmente,

armazena lipídios como fonte energética para sua sobrevivência. O estresse causado pela redução de nutrientes possibilita um acúmulo de energia em forma de lipídios pelas microalgas (CHEN *et al.*, 2011).

Feng *et al.* (2011) estudaram os efeitos da depleção de nitrato de sódio na microalga *Chlorella pyrenoidosa* em meio Guillard f/2, fornecendo o nutriente em intervalos de 24, 48 e 72 h, durante nove dias. O maior rendimento lipídico foi obtido no intervalo de 72 h com 27%, já o menor teor lipídico foi obtido no intervalo de 24 h que apresentou um rendimento de 20%. Dessa forma, quando a microalga foi submetida a uma menor quantidade de nitrato de sódio sofreu um estresse nutricional e, possivelmente, acumulou lipídeo como fonte de energia.

Ruiz-Martinez *et al.* (2012) destacaram a produtividade algal utilizando efluentes domésticos, as densidades celulares dos cultivos foram $1,85 \times 10^9$, $3,82 \times 10^6$ e $7,11 \times 10^8$ cels mL⁻¹, para clorofíceas, diatomáceas e cianofíceas, respectivamente. Em doze dias de cultivo de *C. vulgaris* em efluentes de estação de tratamento, a produção algal máxima foi de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ quando foi utilizado um efluente aeróbico e de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ com um efluente anaeróbico (CABANELAS *et al.*, 2013). He *et al.* (2013) utilizaram diferentes tipos de efluentes urbanos, com diferentes concentrações de amônia e obtiveram de 1,1 a $1,9 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa de *C. vulgaris*. Os mesmo autores também encontraram rendimentos de ácidos graxos de 35,6 até 57,5%, demonstrando a eficiência de *C. vulgaris* em acumular lipídios quando cultivada em efluentes.

A utilização de efluentes com baixas concentrações de amônia induz a microalga *C. vulgaris* a acumular lipídios como fonte de energia, sendo esse procedimento necessário para aumentar sua produtividade lipídica (SILVA, 2013). Com a redução de nitrato de sódio no meio de cultivo de *C. vulgaris*, Silva (2011) também encontrou melhores rendimentos lipídicos nas menores quantidades de nitrato.

Doan; Sivaloganathan e Philip (2011) realizaram um estudo para avaliar o potencial de algumas microalgas marinhas como matéria prima para produção de biodiesel. Os resultados revelaram que a microalga *Nannochloropsis* sp. apresentou tanto a maior concentração de biomassa seca ($0,4 \pm 0,003 \text{ g L}^{-1}$) como também o maior rendimento lipídico (44,9%), sendo bastante favorável como fonte na produção de biodiesel.

Yeesang e Cheirsilp (2011) avaliaram o conteúdo lipídico de quatro microalgas verdes do gênero *Botryococcus*, que foram cultivadas em um meio rico em nitrogênio, tendo como melhor resultado um rendimento lipídico de 25,8%, já no cultivo com deficiência do mesmo nutriente o rendimento foi mais elevado e passou para 35,9%. Feng; Li; Zhang (2011)

avaliaram o rendimento lipídico em três fases de um cultivo semi-contínuo de *C. vulgaris* com efluente urbano e observaram que houve um aumento significativo de 20%, na primeira fase, para 42% na segunda fase, e, em seguida, desceu ligeiramente para 38% na terceira fase. A maior produtividade de lipídios ($147 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi obtida durante a segunda fase em comparação com a primeira ($44 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e a terceira ($79 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), demonstrando que a *C. vulgaris* apresenta ótimo rendimento lipídico e um bom potencial para produção de biocombustível.

O rendimento lipídico da microalga *C. vulgaris* também foi investigado por Yeh e Chang (2012) em diferentes meios oriundos de estação de tratamento municipal de água, utilizando condições fototróficas (NaHCO_3 ou CO_2 , com luz), heterotróficas (glucose, sem luz), fotoheterotróficas (glucose, com a luz) e mixotróficas (glucose e CO_2 , com luz). O maior teor de lipídios (40-53%) e maior produtividade lipídica ($67\text{-}144 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foram obtidos sob condições mixotróficas.

A produção de biocombustíveis para os transportes terrestres e aéreos, individuais ou coletivos, tendo como fonte as microalgas é uma excelente alternativa ao petro-diesel (Figura 3), além de remover compostos nitrogenados e fosfatados de efluentes, sequestrar o CO_2 e produzir O_2 , elas possuem alta concentração de lipídios, sustentabilidade ambiental e potenciais vantagens sobre outras fontes de biocombustíveis (SILVA, 2013).

Figura 3: Transportes movidos à biocombustível a partir de microalgas A) Onibus fabricado pela Isuzu Motor e Euglena Company; B) Toyota Prius; C) Primeiro voo de passageiros da Lufthansa com biocombustível; D) Primeiro voo com 100% combustível oriundo de algas.



Fonte: A) DeuSEL; B) Sapphire; C) Lufthansa; D) EADS & DIAMOND AIRCRAFT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bioprospecção das microalgas

A bioprospecção das microalgas foi realizada em amostras de água de corpos hídricos localizados na região do médio Jaguaribe. Para isso, 100 L de água foram inicialmente filtrados em malhas de 300 e 150 μm para separar partículas maiores, utilizando recipientes graduados com 10 L de volume útil. Em seguida, a amostra foi novamente filtrada em uma rede de plâncton de 25 μm para concentrar as microalgas. As amostras foram armazenadas em copos coletores com volume de 50 mL e transportados em uma caixa térmica até o Laboratório de Tecnologias Aquícolas – LTA do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE *campus* Limoeiro do Norte. Após a bioprospecção, utilizou-se chaves de identificação de microalgas e posteriormente o isolamento.

3.2 Isolamento

O método utilizado para a separação das microalgas foi o isolamento por diluições sucessivas, utilizando um microscópio invertido. Para isso, pequenas porções das amostras foram transferidas, sucessivamente, com pipeta Pasteur para as escavações de uma lâmina com meio de cultura Guillard f/2 até atingir a condição de apenas uma espécie. Após o isolamento, a espécie selecionada foi transferida para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura para promover o crescimento algal. A cepa isolada foi mantida nos tubos de ensaio com meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975) dentro de uma câmara de germinação com temperatura (21 °C), iluminação ($60 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo controlados (16 h escuro e 08 h claro).

3.3 Cultivo das microalgas com efluentes aquícolas

A microalga isolada foi cultivada de forma estacionária, utilizando Erlenmeyers de 5 L. Todo o material utilizado e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 120 °C para evitar qualquer tipo de contaminação. As condições de cultivo permaneceram constantes, com temperatura ambiente (28 ± 1 °C), luminosidade em torno de

60 $\mu\text{E cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, e aeração constante promovida por um soprador com uma vazão de $3,0 \pm 1,0 \text{ L ar min}^{-1}$.

Foram realizados 2 tratamentos com cinco repetições, utilizando os efluentes de piscicultura e carcinicultura (Tabela 2) como meios de cultura para as microalgas. Os inóculos foram aclimatados a cada meio de cultura durante três dias, utilizando inicialmente Erlenmeyers de 250 mL e, posteriormente, vidrarias de 1 L, sob as mesmas condições de temperatura, luminosidade e aeração.

Tabela 2 - Composição dos efluentes da aquicultura utilizados como meio de cultura.

Efluente	Parâmetros				Salinidade
	Amônia (mg L^{-1})	Nitrito (mg L^{-1})	Nitrato (mg L^{-1})	Fósforo (mg L^{-1})	
Carcinicultura	0,072	0,062	0,952	3,354	0
Piscicultura	0,088	0,009	1,235	2,519	0

Em cada tratamento (meio de cultura), as microalgas foram inoculadas em uma densidade óptica ($\text{DO}_{680\text{nm}}$) inicial próxima de 0,100 e, diariamente, a $\text{DO}_{680\text{nm}}$ foi determinada, utilizando um espectrofotômetro para acompanhar o desenvolvimento das culturas.

As concentrações de N-amoniaco, N-nitritos, N-nitratos e fosfatos foram determinadas nos meios de cultura por espectrofotometria, no início (primeiro dia), na metade (terceiro dia) e fim do cultivo, quando o mesmo atingir a fase estacionária. Para isso, amostras de 100 mL, de cada repetição, foram retiradas e centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min. Em seguida, a cada 25 mL das amostras foram adicionados os reagentes NitriVer 3 Nitrite, NitraVer 5 Nitrate, PhosVer 3 Phosphate para as determinações das concentrações de nitritos, nitratos e fosfatos, respectivamente. O método de Nessler foi utilizado para determinação da amônia, sendo utilizados 1,0 mL do reagente de Nessler, 3 gotas de estabilizante mineral e 3 gotas e álcool polivinílico. Após o tempo de reação, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro (HACH 2000) e a concentração dos compostos expressa em mg L^{-1} .

Os efluentes de piscicultura foram coletados durante as fases de larvicultura e alevinagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em viveiros escavados e o da carcinicultura ao final da fase de terminação ou engorda do camarão *Litopenaeus vannamei*

também realizada em viveiros. Os efluentes foram coletados de empreendimentos aquícolas instalados na região do médio Jaguaribe de onde a microalga utilizada também foi isolada. Durante a coleta, os efluentes foram filtrados em uma malha de 60 μm para retirada dos sólidos em suspensão e, em seguida, transportados em recipientes de 1.000 L até o LTA do IFCE – *Campus* Limoeiro do Norte, onde foram autoclavados a 120 °C durante 15 minutos para eliminar bactérias e outros possíveis contaminantes que podem interferir no desenvolvimento algal e evitar o processo de nitrificação, mantendo as propriedades dos nutrientes avaliados.

3.4 Correlação entre densidade óptica ($\text{DO}_{680\text{nm}}$) e peso seco (PS)

Ao final do experimento, foram coletadas amostras das cinco repetições de cada tratamento e realizadas várias diluições. Para cada diluição foi determinada sua respectiva absorvância ($\text{DO}_{680\text{nm}}$) e, posteriormente, 100 mL de cada diluição foi centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos, sendo separado o sobrenadante. Em seguida a biomassa precipitada foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C durante 24 h. Os valores de absorvância ($\text{DO}_{680\text{nm}}$) de cada diluição e seus respectivos pesos secos (PS) foram utilizados para a determinação de uma correlação linear. A partir da correlação entre essas duas variáveis, foram determinadas suas respectivas equações de regressão linear (LIU; WANG; ZHOU, 2008).

3.5 Parâmetros de rendimento cinético e lipídico

Após a obtenção dos dados de biomassa seca, foi calculada a taxa de crescimento em divisões por dia (K) até o dia de maior produtividade das culturas (OHSE *et al.*, 2008). Esse parâmetro foi obtido de acordo com a equação 1, descrita por Lourenço (2006):

$$K = \log_2 \left(\frac{N_f / N_0}{D_t} \right) \quad (1)$$

Na qual:

K– taxa de crescimento em duplicação por dia (divisões dia^{-1}),

N_0 e N_f – Biomassa seca no início e no dia em que o cultivo obteve a máxima concentração celular, respectivamente,

Dt - tempo de cultivo em dias.

3.6 Recuperação total da biomassa algal

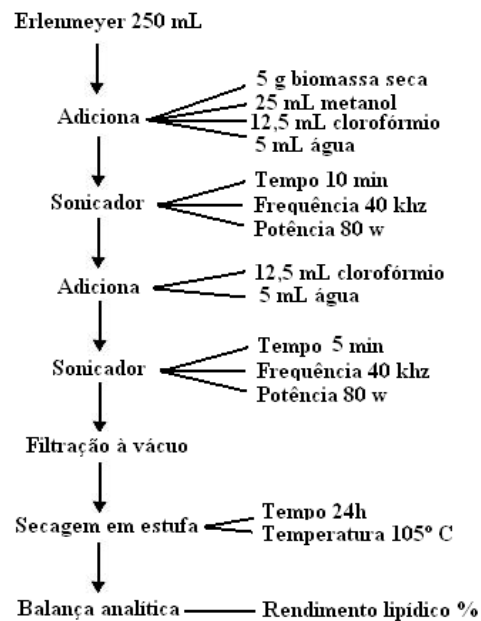
A recuperação total da biomassa algal foi realizada na fase estacionária. Para essa separação, os cultivos foram submetidos a uma floculação química induzida pelo aumento do pH do meio, utilizando uma solução de hidróxido de sódio 2 N (NaOH) (ARAUJO *et al.*, 2013).

Após a completa floculação e sedimentação, o sobrenadante foi retirado e os flocos lavados com água destilada para retirada do agente floculante e vestígios do meio de cultura. Posteriormente, a biomassa recuperada da microalga foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por 24 h e pesada em balança analítica para a determinação do rendimento, produção (g L^{-1}) e produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

3.7 Extração e rendimento lipídico

O método de Bligh e Dyer (1959) foi utilizado para extração lipídica. Foram adicionados a 5 g de biomassa seca da microalga, em triplicata, em um Erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. O Erlenmeyer foi tampado e levado para sonicar, em banho ultrasônico com frequência de 40 kHz e potência de 80 W durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água e realizada outra sonicação com duração de 5 minutos. A parte sólida foi filtrada a vácuo e, posteriormente, seca em estufa durante 24 horas a 105 °C, sendo finalmente pesada em balança analítica para determinação do rendimento lipídico, de acordo com o fluxograma da figura 4.

Figura 4 - Fluxograma do método de extração lipídica Bligh; Dyer (1959).



Fonte: O autor

A produtividade e o rendimento de lipídios foram determinados de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente, descritas por Converti (2009):

$$v = \frac{C_L}{t} \quad (2)$$

Na qual:

v – Produtividade em $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$,

C_L – Concentração de lipídios no final do experimento em g L^{-1} ,

t – Duração do cultivo em dias.

$$Y = \left(\frac{W_L}{W_{DA}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Na qual:

Y – Rendimento em $\text{g} \text{ } 100 \text{ g de alga seca}^{-1}$,

W_L - Peso de lipídeo extraído em g,

W_{DA} - Peso da biomassa seca no fim das culturas (g).

3.8 Caracterização dos lipídios extraídos das microalgas

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Processos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, por meio de cromatografia gasosa (CG), utilizando o método Ce 2-66 da AOCS (1997).

Para esse método, utilizou-se KOH 0,5 mol L⁻¹ em metanol anidro (reagente de saponificação), uma solução contendo 20 g de NH₄Cl + 600 mL de metanol anidro + 30 mL de H₂SO₄ concentrado (reagente de esterificação), uma solução aquosa saturada de NaCl (solução salina) e éter de petróleo.

Para analisar os ésteres metílicos, foi utilizado um cromatógrafo a gás CGC Agilent-6850 série GC SYSTEM acoplado a um detector de ionização de chama, FID (*flame ionization detector*) e a um integrador, utilizando uma coluna capilar OV-1 (dimetilsilicone) com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme líquido. O fluxo da coluna foi ajustado para 1,0 mL min⁻¹, o volume injetado foi de 1,0 mL e o hélio (99,95%) foi utilizado como gás de arraste.

Cerca de 50 mg do óleo extraído da biomassa seca de cada tratamento foram misturados com 4,0 mL do reagente de saponificação, sendo o tubo com a mistura agitado em água fervente durante cinco minutos. Após o resfriamento do tubo, foram adicionados 5 mL do reagente de esterificação e o tubo com a mistura foi novamente agitado em água fervente durante cinco minutos. Após o resfriamento do tubo, 4,0 mL da solução salina e 5 mL de éter de petróleo foram adicionados, agitando novamente. O tubo ficou em repouso até a completa separação das fases e, posteriormente uma alíquota da fase superior contendo os ésteres metílicos foi retirada e injetada no cromatógrafo. O mesmo procedimento foi realizado com o óleo mostarda (óleo referência), cujos teores dos ésteres são conhecidos.

Comparando o tempo de retenção (t_R) dos ésteres de cada óleo com o tempo de retenção dos ésteres do óleo de mostarda foi possível identificar a composição percentual de cada componente do óleo da microalga. Para a obtenção da massa molar média dos ésteres metílicos provenientes da transesterificação de óleos vegetais, utilizou-se a equação 4 (VARGAS, 1996).

$$MMM (\text{ésteres metílicos}) = \frac{\sum[(A_i) \times (MM_i)]}{\sum(A_i)} \quad (4)$$

Na qual:

A_i - Teor em porcentagem do éster i ;

MM_i - Massa molar do éster i (g mol^{-1})

A massa molar (MM) do óleo da microalga será calculada utilizando a equação 5.

$$MM (\text{óleo da microalga}) = [(3 \times MMM \text{ dos ésteres metílicos}) - 4] \quad (5)$$

3.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste t de *Student*, com nível de significância 5%, utilizando o programa BioEstat 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioprospecção, Isolamento e cultivo da *Chlorella vulgaris*

Três pontos de coletas no açude Castanhão, Jaguaribara (Ceará, Brasil) foram escolhidos para a realização da prospecção das microalgas (Figura 5), a região foi escolhida por apresentar intensa atividade de cultivos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema intensivo em tanques de rede, com elevada concentração de nutrientes gerada pelas excretas dos peixes e sobras de ração, onde são incorporados pelas microalgas para seu desenvolvimento.

Figura 5 – Açude Castanhão, Jaguaribara (Ceará, Brasil), evidenciando os pontos de coleta.

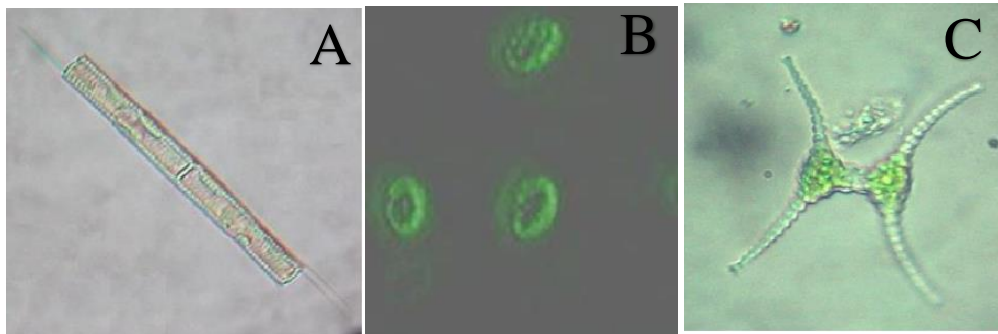


Fonte: Google Earth

Após a bioprospecção, utilizando o trabalho de Barsanti e Gualtieri (2006), foi realizada a classificação sistemática e a identificação foi baseada nos trabalhos de Bicudo e Menezes (2006) e Franceschini *et al.*, (2010). Inicialmente três espécies se destacaram: *Alacouseira* sp., *Staurastru chaetoceras* e *Chlorella vulgaris* (Figura 6). A microalga selecionada para o andamento do trabalho foi a *Chlorella vulgaris* (BEYERINCK, 1890), a mesma foi isolada pelo método de diluição, apresentando excelente resultado de crescimento e adaptação ao meio de cultura padrão Guillard F/2, que foi utilizado para manutenção do inóculo, como também aos efluentes que foram utilizados como meio de cultura durante a pesquisa,

além de não apresentar contaminação em grande volume, processo que ocorreu com as outras duas espécies ao elevar o volume de cultivo.

Figura 6- *Alacouseira* sp. (A), *Chlorella vulgaris* (B) e *Staurastru chaetoceras* (C)



Fonte: O autor.

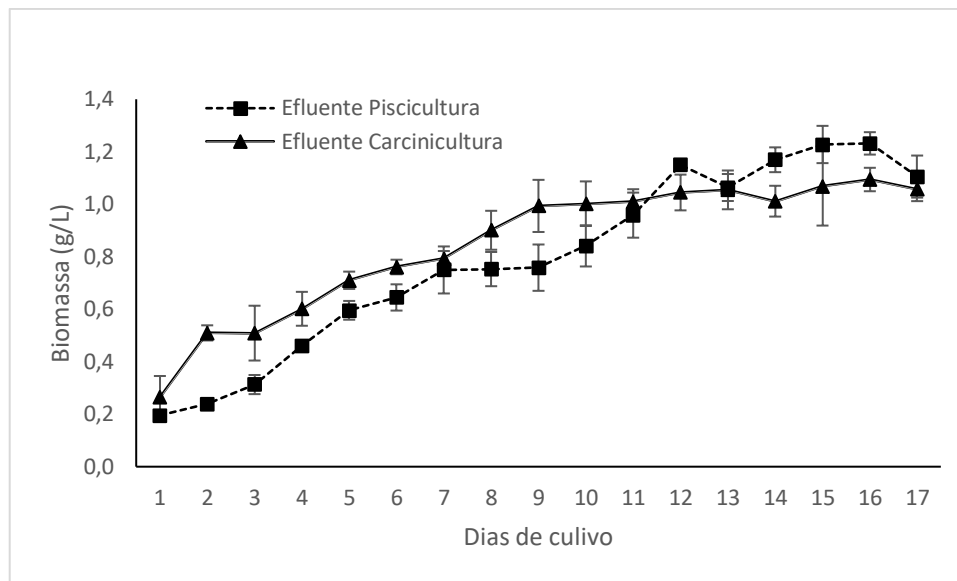
A *C. vulgaris* apresenta crescimento acentuado em diferentes meios de cultura, sendo uma espécie resistente à contaminação por outras microalgas. A recuperação de bioamassa e incorporação de nutrientes também são vantagens que a *C. vulgaris* possui, apresentando requisitos favoráveis para uma microalga de cultivo de média e grande escala (FERNÁNDEZ-LINARES *et al.*, 2017).

A incorporação de efluentes ricos em compostos nitrogenados e fosfatados é uma característica favorável da *C. vulgaris*, desde efluentes brutos como diluídos (EVANS *et al.*, 2017). Commault *et al.* (2017) observaram que a *C. vulgaris* se adaptou muito bem em efluente industrial, removendo os compostos nitrogenados com eficiência, acumulando biomassa e produzindo oxigênio para células de combustíveis microbianos.

4.2 Curva de crescimento da *C. vulgaris* em efluentes aquícolas

Os cultivos apresentaram um comportamento semelhante no crescimento e na recuperação final de biomassa (Figura 7), também não houve fase de indução em ambos cultivos, evidenciando a boa adaptação da microalga às novas condições de cultivo. A curva de crescimento com efluente de carcinicultura obteve um crescimento exponencial logo no primeiro dia de cultivo, a partir do segundo dia as células apresentaram um crescimento mais lento até do décimo terceiro dia, atingindo a fase estacionária do décimo quarto dia até o fim do experimento.

Figura 7. Curvas de crescimento da *C. vulgaris*, com efluentes aquícolas.



Fonte. Dados do experimento.

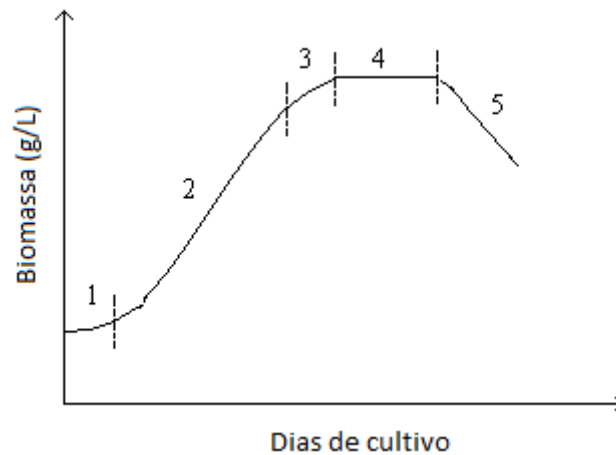
A curva de crescimento com efluente da piscicultura teve crescimento exponencial até o sétimo dia, tendo a partir do sétimo até o nono dia um crescimento lento, como ainda havia nutrientes no meio de cultura a curva voltou a crescer acentuadamente até o décimo segundo dia, posteriormente apresentou uma leve queda seguida pela fase estacionária até o fim do experimento.

Os cultivos apresentaram rendimento de biomassa semelhantes, com resultados de $1,105 \text{ g L}^{-1}$ para o efluente de piscicultura e $1,057 \text{ g L}^{-1}$ para o efluente de carcinicultura. Essa semelhança, possivelmente, foi observada devido às quantidades de nutrientes, nos respectivos efluentes, como amônia e nitrato serem próximas, pois ambos são as principais fontes de nitrogênio das microalgas (LOURENÇO, 2006).

Znad *et al.* (2017), observaram um crescimento maior que o meio de cultura padrão Guillard f/2 ao utilizar o efluente urbano como meio de cultura, demonstrando a eficácia da *C. vulgaris* na recuperação de biomassa ao ser cultivada em água de rejeito urbano.

Segundo Hernandez *et al.* (2009), após a inoculação de uma microalga em meio de cultura enriquecido com nutrientes ocorre o crescimento populacional ao longo do tempo que, geralmente, apresenta uma curva com cinco fases distintas (Figura 8). A curva do presente trabalho apresentou as fases de uma curva de crescimento típico, mas não seguindo o padrão de incremento algal.

Figura 8 - Curva de crescimento típica de uma população de microalgas expressa em densidade celular por dia de cultivo



Fonte: FAO (1996).

Na primeira fase, praticamente não ocorre aumento populacional devido à aclimação das células ao novo ambiente de cultivo. Na segunda fase, as células já estão aclimatadas ao novo meio e, com isso, ocorre um incremento exponencial da população algal. A terceira fase é a de desaceleração de crescimento, na qual a depleção dos nutrientes diminui a taxa de crescimento. Em seguida, com uma maior redução de nutrientes e aumento de metabólitos no meio, a taxa de crescimento se iguala à taxa de mortalidade, mantendo a população constante por um determinado período, caracterizado como a fase estacionária do cultivo. Finalmente, com o completo esgotamento dos nutrientes, grande quantidade de metabólitos e autólise celular, o cultivo entra na fase de morte, resultando em uma significativa redução da população algal.

4.3 Fitorremediação dos efluentes aquícolas utilizando *C. vulgaris*

Durante os cultivos utilizando efluentes aquícolas como meio de cultura, observa-se um incremento algal inversamente proporcional à depleção de nutrientes, evidenciando que a água de descarte da aquicultura possui nutrientes suficientes para o desenvolvimento da *C. vulgaris*, além de reduzi-los, diminuindo o impacto ao ambiente e possibilitando o reuso da água (Figura 9).

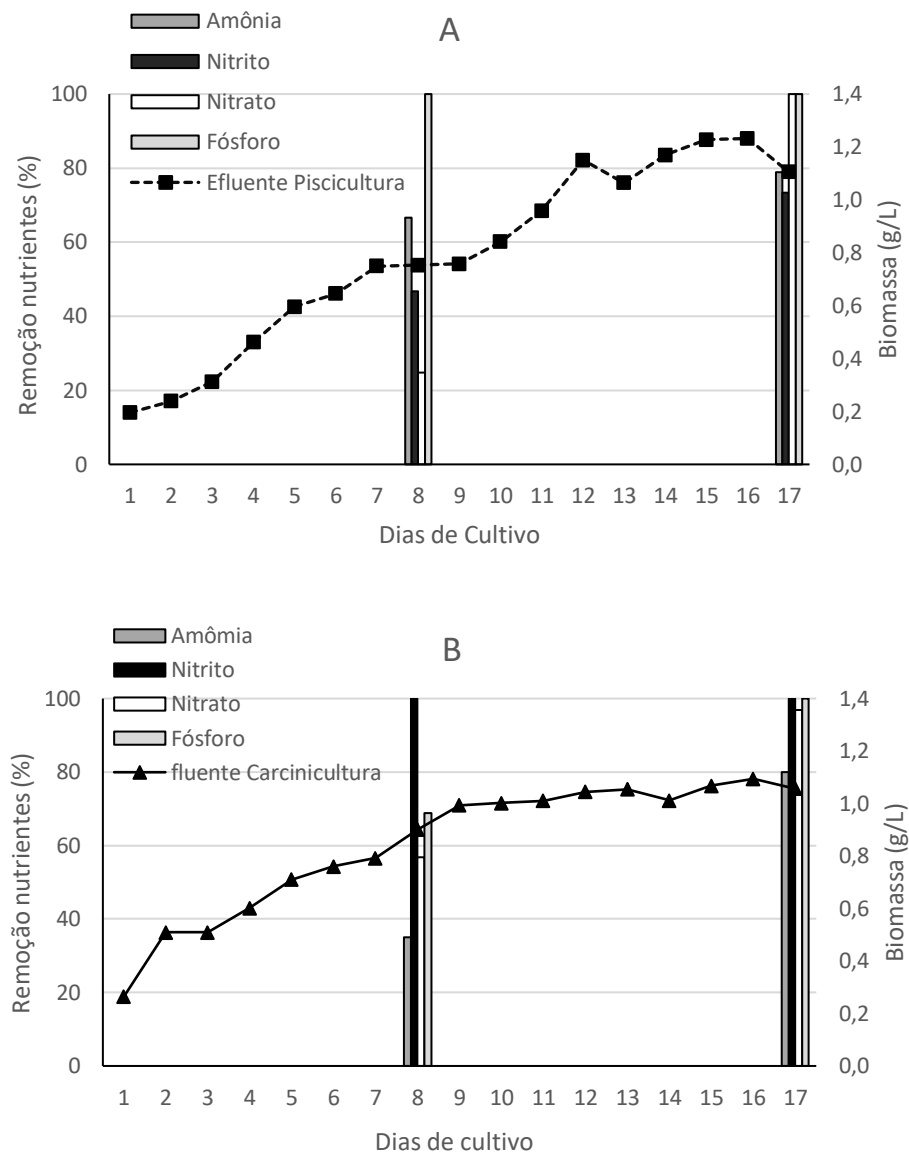
A medida que os nutrientes são consumidos, principalmente nitrato e fosfatos, há uma desaceleração da taxa de crescimento, comportamento também observado por Wen *et al.* (2017) quando cultivaram *C. vulgaris* em efluente suíno.

Na primeira determinação de nutrientes, oitavo dia de cultivo, a microalga obteve maior eficiência de remoção de amônia e fósforo no efluente de piscicultura com resultados 66,59 e 99,98%, respectivamente, e o efluente de carcinicultura com 35,00 e 68,75% de remoção de amônia e fósforo, respectivamente, mas o mesmo apresentou maior remoção de nitrito e nitrato, sendo observado 100 e 56,77%, respectivamente, enquanto a remoção para os mesmos parâmetros no efluente de piscicultura foi de 47,67 e 24,79%, respectivamente.

Esses resultados demonstram que a *C. vulgaris*, durante os oito primeiros dias, utilizou mais amônia no efluente de piscicultura e mais nitrato no efluente de carcinicultura como fonte de nitrogênio para seu crescimento. Em relação à determinação do fósforo, o efluente piscícola o removeu quase em sua totalidade, já o efluente de carcinicultura removeu 68,75%, sendo observado uma maior necessidade de absorção de fósforo da *C. vulgaris* quando cultivada em efluente de piscicultura durante este período.

Ao final do experimento as remoções de amônia, nitrato e fósforo não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, com remoção de 78,86, 99,99 e 99,98%, respectivamente, no cultivo com efluente de piscicultura e 80,00, 96,84 e 100%, respectivamente, no cultivo com efluente de carcinicultura. O nitrito foi o único parâmetro com diferença entre os cultivos ($p \leq 0,05$) com efluente piscícola e de fazenda de camarão, com remoção de 73,33 e 100%, respectivamente. O resultado final também demonstra que o nitrato foi o composto nitrogenado mais absorvido pela *C. vulgaris* quando cultivada em efluente de piscicultura, já no efluente de carcinicultura a absorção nitrogenada foi maior no nitrito e nitrato, em relação à amônia. Segundo Lourenço (2006), a maior incorporação do nitrato ocorre por ser a forma mais estável de nitrogênio na água.

Figura 9 - Curvas de crescimento e de remoção de nutrientes nos cultivos de *C. vulgaris* com efluente de piscicultura (A) e carcinicultura (B).



Fonte. O autor.

Liu *et al.* (2017), cultivaram a *C. vulgaris* em efluente urbano com injeção de dióxido de carbono obteve uma remoção de 99% de fósforo e 87% de amônia. Znad *et al.* (2018) trabalhando também com a *C. vulgaris* cultivada em efluente urbano para avaliação da remoção de nutrientes obteve remoção de 79 e 100% para amônia e fósforo, respectivamente, ambos resultados são semelhantes ao presente trabalho. Lam *et al.* (2017), utilizou efluente doméstico como meio de cultura na produção de biomassa de *C. vulgaris* e obteve remoção de 85% de amônia e 35% de fósforo, já Mutjaba e Lee (2017), utilizaram águas residuais de tratamento

urbano e utilizou a *C. vulgaris* na imobilização dos nutrientes, conseguindo uma remoção de 95% de amônia e 90% de fósforo, em outro trabalho Mutjaba, Rizwan, e Lee (2017), a *C. vulgaris* removeu 70% de amônia e 66% de fósforo quando cultivada em efluente de tratamento de esgoto doméstica. Esses estudos demonstram que a *C. vulgaris* removeu amônia e fósforo com eficiência, mas dependendo do tipo de efluente a remoção apresentou valores diferenciados, assim como no presente experimento, onde as remediações destes compostos foram diferentes nos dois tipos de meio de cultura.

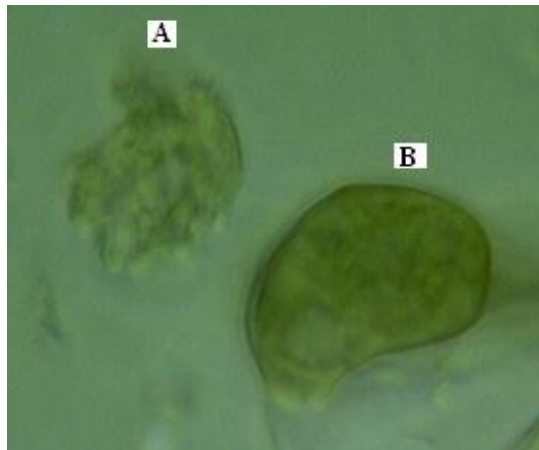
Shen *et al.* (2015), trataram águas residuais salinas com *C. vulgaris* e ao determinar os nutrientes obtiveram remoção de 100% de nitrito e nitrato em vinte dias de cultivo. Arun *et al.* (2017), observaram 78% de remoção de nitrato após 15 dias de cultivo da *C. vulgaris* em efluente urbano em fotobiorreator e com adição de dióxido de carbono.

Silva (2013), ao cultivar *C. vulgaris* em água de descarte de empreendimentos aquícolas determinou remoção de 94 e 70% nos efluentes de carcinicultura e piscicultura, respectivamente, resultado semelhante ao presente estudo. Esses estudos relatam o elevado potencial de remoção de compostos nitrogenados e fosfatados nos efluentes urbanos, suínícolas e aquícolas, ao utiliza-los como meio de cultura na produção de *C. vulgaris*, microalga que também tem como vantagem ser uma espécie nativa, com características de adaptação favoráveis às condições físicas, químicas e biológicas de cultivo.

4.4 Rendimento de biomassa e lipídico da *C. vulgaris* cultivada em efluentes aquícolas

Para otimizar a extração lipídica, realizou-se o processo de sonicação das células de *C. vulgaris*, pois a espécie possui celulose na parede celular. Segundo Silva, (2013), a sonicação facilita a saída dos componentes celulares, pois rompe a parede e membrana celular (Figura 10).

Figura 10 - Célula da *C. vulgaris* sem membrana após sonicação (A) e célula com membrana celular intacta (B).



Fonte: O autor.

Com a ruptura da membrana celular todo o conteúdo interno da microalga ficou disponível para extração e, posteriormente para determinação da produção de lipídios. O método de sonicação possui alta eficiência e baixo requerimento energético, tornando-o viável. Esta técnica tem sido bastante utilizada para extrair diversas substâncias de baixo peso molecular e para compostos bioativos de vegetais (SILVA *et al.*, 2015).

Os parâmetros de rendimento cinético não apresentaram diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), possivelmente pela proporção semelhante de nutrientes dissolvidos nos efluentes. Os resultados demonstram que efluentes aquícolas são eficientes na recuperação de biomassa algal. O rendimento e produtividade lipídica apresentaram diferença ($p \leq 0,05$) com o cultivo utilizando efluente piscícola superior ao efluente de carcinicultura (Tabela 3). O cultivo com efluente de piscicultura apresentou uma necessidade em acumular energia na forma de lipídio, possivelmente, pela acentuada absorção de amônia e fósforo nos oito primeiros dias e a queda no crescimento do sétimo ao nono dia, posteriormente, a alga direcionou a absorção nitrogenada para o nitrato e retomando o crescimento, esse estresse, provavelmente, resultou em um rendimento mais elevado ao final do experimento.

Tabela 3 – Médias e desvio padrão de rendimento cinético e lipídico dos cultivos de *Chlorella vulgaris* em efluente de e piscicultura e carcinicultura ($p \leq 0,05$).

Efluente	Produção total de alga seca (g)	Produtividade algal ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$)	Rendimento lipídico ($\text{g 100g de alga seca}^{-1}$)	Produtividade lipídica ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$)
Piscicultura	$3,874 \pm 0,212^a$	$0,065 \pm 0,006^a$	$12,000 \pm 0,719^a$	$0,201 \pm 0,003^a$
Carcinicultura	$3,672 \pm 0,491^a$	$0,062 \pm 0,009^a$	$8,902 \pm 0,423^b$	$0,149 \pm 0,002^b$

*Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Li *et al.* (2013a) cultivaram durante cinco dias a *C. vulgaris* em efluente de ácido cítrico, obteve produção máxima de $0,606 \text{ g L}^{-1}$. Em onze dias de cultivo, Wang *et al.* (2015) produziram maior concentração de biomassa de $3,96 \text{ g L}^{-1}$ em efluente de suinicultura diluído em cinco partes. Esses resultados corroboram com o presente estudo, provando que é possível uma recuperação de biomassa algal utilizando efluentes. He *et al.* (2013) variaram a concentração de amônia no meio de cultura composto por diferentes efluentes urbanos, resultando em $1,1$ a $1,9 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa de *C. vulgaris*. No mesmo trabalho os autores obtiveram rendimento lipídico de $35,6$ até $57,5\%$, demonstrando a eficiência da *C. vulgaris* em acumular lipídios quando cultivada em efluentes.

Huang *et al.* (2017) avaliaram o rendimento algal e lipídico da *C. vulgaris* em efluente doméstico tratado, obtendo rendimento de biomassa de $4,7 \text{ g L}^{-1}$ e maior produtividade lipídica $61,29 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Rincon *et al.* (2017) produziram biomassa de *C. vulgaris* em condições mixotróficas e obtiveram produtividades algais de $9,27 \pm 0,47 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e $12,64 \pm 0,94 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ quando utilizou concentrações iniciais de glicerol de 2 e 5 g L^{-1} , obtendo também conteúdo lipídico de $13 \pm 0,02$ e $23,91 \pm 0,03\%$, respectivamente. Miao *et al.* (2016) utilizaram efluente doméstico sintético como meio de cultura para a *C. vulgaris* e os resultados mostraram que a taxa de crescimento e biomassa foi significativamente promovida pelas águas residuais domésticas em comparação com o meio BG11 (controle), a concentração algal máxima ($17,94 \times 10^6 \text{ cels L}^{-1}$) foi obtida quando foram utilizadas 100% de águas residuais domésticas. A microalga coletada apresentou teor lipídico de $23,4$ e $28,5\%$.

O rendimento lipídico da microalga *Chlorella vulgaris* também foi investigado por Yeh e Chang (2012) em diferentes meios e condições de cultivo, oriundos de estação de tratamento municipal, os métodos do seguinte experimento foi o crescimento fototrófico

(NaHCO₃ ou CO₂, com luz), heterotrófico (glucose, sem luz), fotoheterotrófico (glicose, com a luz) e mixotróficas (glucose e CO₂, com luz). O maior teor de lipídios (40-53%), concentração de biomassa de 2-5 g L⁻¹ e maior produtividade lipídica (67-144 mg⁻¹ L⁻¹ d⁻¹) foram obtidos sob condições de cultivo mixotróficas. Os resultados da literatura, assim como o presente trabalho, confirmam que a *C. vulgaris* é uma microalga bastante promissora na produção de biomassa e rendimento lipídico.

4.5 Identificação dos ácidos graxos presentes no óleo da microalga

A caracterização dos ácidos graxos da *C. vulgaris* identificou a presença dos ácidos palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico e erúxico, todos diferiram significativamente quando comparados os efluentes utilizados, sendo que no efluente de carcinicultura o ácido oléico apresentou maior porcentagem e no efluente de piscicultura o ácido mais presente foi o erúxico (Tabela 4). Para produção de biodiesel o efluente da carcinicultura demonstrou maior viabilidade, pois o ácido palmítico não possui insaturação na cadeia carbônica. Os resultados demonstram que a *C. vulgaris* quando cultivada em efluentes aquícolas produz ácidos graxos que podem ser utilizados em diversas aplicações.

Tabela 4 – Porcentagem de ácidos graxos presentes no óleo obtido de *C. vulgaris* cultivada em efluentes aquícolas e comparação com outros perfis de ácidos graxos.

Ácidos graxos	Presente estudo		Rincon <i>et al.</i> , (2017)	Mohd-Sahib <i>et al.</i> (2017)	Deng <i>et al.</i> , (2017)	Liao <i>et al.</i> , (2017)
	Piscicultura (%)	Carcinicultura (%)				
Palmítico (C16:0)	7,3 ^b	17,7 ^a	18,15	20,4	11,8	30,77
Palmitoléico (C16:1)	14,5 ^a	7,1 ^b	2,71	0,4	10,9	5,36
Esteárico (C18:0)	14,9 ^a	5,9 ^b	3,03	3,7	1,7	4,06
Oléico (C18:1)	26,2 ^b	54,6 ^a	37,68	36,8	49,2	21,34
Linoléico (C18:2)	10,6 ^a	3,6 ^b	32,91	0,6	20,3	23,03
Erúxico (C22:1)	26,5 ^a	11,1 ^b	ND	1,2	ND	ND

*Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05).

ND: não detectado

Fonte: O autor e literatura citada

Existem diferenças no perfil de ácidos graxos nos cultivos de microalgas, provavelmente, devido às diferentes condições de cultivo como luminosidade, espécie,

salinidade e principalmente a composição do meio de cultura. Com isso, os parâmetros físicos, químicos e biológicos interferem nos resultados quali-quantitativos dos ácidos graxos identificados na produção de microalgas (HEO *et al.*, 2017).

A utilização das microalgas em diversas aplicações biotecnológicas, como a produção de biodiesel, é uma excelente alternativa, além de promover a remediação de efluentes, sequestram o CO₂ e produzem O₂, com sustentabilidade ambiental e potenciais vantagens sobre outras fontes de biomassa e lipídios.

5 CONCLUSÃO

A microalga *Chlorella vulgaris* demonstrou elevada eficiência na remoção dos compostos nitrogenados e fosfatados dos efluentes da aquicultura, podendo ser utilizada como ferramenta de biotratamento da água de descarte dos empreendimentos aquícolas, liberando-os com segurança ambiental e/ou reutilizando-os, também apresentou bom rendimento algal sem diferença de produção entre os tratamentos, demonstrando ser uma cultivar relevante na produção de biomassa vegetal.

O rendimento e produtividade lipídica foi superior ao utilizar o efluente piscícola, mas ambos efluentes possuem alto potencial no cultivo da *C. vulgaris* para produção de lipídios. O perfil de ácidos graxos da *C. vulgaris* indica que os mesmos podem ser utilizados em diversas aplicações, desde nutracêuticas até biocombustíveis, sendo o tratamento com efluente de carcinicultura o mais indicado para produção de biodiesel, pois apresenta maior teor de ácido palmítico.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K. A.; POTS, T. P.; FREEMAN, S.; ISRAEL, D. JOHANSEN, J. KLETOU, D.; MELAND, M.; PECORINO, D.; REBOURS, C.; SHORTEN, M.; ANGEL, D. L. The implications of aquaculture policy and regulation for the development of integrated multi-trophic aquaculture in Europe. **Aquaculture**, Amsteram, v. 443, p. 16-23, Mar 2015.

ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. R. L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, Melbourne, v. 20, n. 1, p. 95-98, Jan 2013.

ARITA, C. E. Q.; PEEBLES, C.; BRADLEY, T. H.; Scalability of combining microalgae-based biofuels with wastewater facilities: A review. **Algal Research**, Amsterdam, v. 9, p. 160-169, Mar 2015.

ARUN, J.; SHREEKANTH, S. J.; SAHANA, R.; RAGHAVI, M. S.; GOPINATH, K. P.; GNANAPRAKASH, D. Studies on influence of process parameters on hydrothermal catalytic liquefaction of microalgae (*Chlorella vulgaris*) biomass grown in wastewater. **Bioresource Technology**, London, v. 244, p. 963-968, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official method Ca 5a-40, Free fatty acids. In: Firestone, D. E. (Ed.) **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign IL: AOCS Press, 1997.

BARSANTI, L. e GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, London, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, Mar 2010.

BERBEROGLU, H.; GOMEZ, P. S.; PILON, L. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococccum littorale*, and *Chlorella* sp. used for CO₂ fixation and biofuel production. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, Oxford, v. 110, n. 17, p. 1879-1893. Nov 2009.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B.; REBELO, A. M. Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 85-92, jul 2007.

BEIYERINCK, M. W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, Berlin, v. 48, n. 45, p. 725-785, Nov 1890.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**, São Carlos: Rima, v. 2, p. 03-06, 2006.

BILLER, P.; ROSS, A. B. Pyrolysis GC–MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. **Algal Research**, Amsterdam, v. 6, p. 91-97, Oct 2014.

BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug 1959.

BOROWITZKA, M. A. (2006) Biotechnological & Environmental Applications of Microalgae. **Biotechnological & Environmental Applications of Microalgae**. [Online] Murdoch University, 2006. Disponível em: <http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-App10.html>. Acesso em 14 de maio de 2015.

BOSMA R. H.; VERDEGEM M. C. G. Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limit. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 139, n 1–2, p. 58-68, July 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Produção da aquicultura, por tipo de produto. **Pesquisa Pecuária Municipal**. CIDADE, v. 1, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br>>, Acesso em: 11 de nov. 2017.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura - MPA (2013). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, DF, 128p. 2013.

BUHMANN, A; PAPENBROCK, J. Biofiltering of aquaculture effluents by halophytic plants: Basic principles, current uses and future perspectives. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 92, p. 122-133, Jul 2013.

CABANELAS I. T. D.; RUIZ J.; ARBIB Z.; CHINALIA F. A.; GARRIDO-PÉREZ.; ROGALLA F.; NASCIMENTO I. A.; PERALES J. A. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal **Bioresource Technology**, London, v. 131, p. 429 – 436, March 2013.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI Y.; Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 19, p. 360-369, 2013.

CASTELLANI, D.; CAMARGO, A. F. M.; ABOMORAD, E. G. Aquaponia: aproveitamento do efluente do berçário secundário do Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) para produção de alface (*Lactuca sativa*) e agrião (*Rorippa nasturtium aquaticum*) hidropônicos. **Bioikos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 67-75, Dez 2009.

CHANG, Z.; DUAN, P.; XU, Y. Catalytic hydrolysis of microalgae: Influence of operating variables on the formation and composition of bio-oil. **Bioresource Technology**, London, v. 184, p. 349-354, Aug 2015.

CHARITY, E. A. R.; ALEXANDRA, L. V. B.; CARMEN, H. C. L.; EVER, D. M. A. Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. **Revista**

Tecnica de la Facultad de Ingenieria Universidad del Zulia. maracaibo v. 32, n. 2, p. 126 - 134, Aug 2009.

CHEN, S.; YU, J.; WANG, W.; YUY, H.; QUAN, X. A pilot-scale coupling catalytic ozonation–membranefiltration system for recirculating aquaculture wastewater treatment.

Desalination, Amsterdam, v. 363, p. 37-43, Sep 2015.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*.

Bioresource Technology, Amsterdam, v. 102, n. 2. p. 1649-1655, Jan 2011.

CHIAIESE P.; PALOMBA F.; TATINO F.; LANZILLO C.; PINTO G.; POLLIO A.; FILIPPONE E. Engineered tobacco and microalgae secreting the fungal laccase POXA1b reduce phenol content in olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 49, n. 6–7, p. 540-546, Dec 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 294-306, May 2007.

CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y-K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, London, v. 102, n. 18, p. 8639-8645, Sep 2011.

COMMAULT, A. S.; LACZKA, O.; SIBONI, S.; TAMBURIC, B.; CROSSWEL, J. R.; SEYMOUR, J. R.; RALPH, P. J. Electricity and biomass production in a bacteria-*Chlorella* based microbial fuel cell treating wastewater. **Journal of Power Sources**, Lausanne, v. 356, p. 299-309, 2017

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

DAVID, G. S.; CARVALHO, E. D.; LEMOS, D.; SILVEIRA, A. N.; DALL'AGLIO-SOBRINHO, M. Ecological carrying capacity for intensive tilapia (*Oreochromis niloticus*) cage aquaculture in a large hydroelectrical reservoir in Southeastern Brazil **Aquacultural Engineering**, London, v. 66, p. 30-40, Feb 2015.

De La HOZ, S.; BEM-ZVI, A.; BURREL, R. E.; McCAFFREY, W. C.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Bioresource Technology**, London, v. 102, n. 10, p. 5764-5774, 2011.

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

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

DOAN, T. T. Y.; SILVALOGANATHAN, B; PHILIP, J. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, London v. 35, n. 7, p. 2534-2544, July 2011.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**. Barking, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, Oct 2011.

EL-KASSAS, H. Y.; MOHAMED, L. A. Bioremediation of the textile waste effluente by *Chlorella vulgaris*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, Alexandria, v. 40, p. 301-308, 2014.

EL-SAYED, H. S.; IBRAHIM, H. A. H.; BELTAGY, E. A.; KHAIRY, H. M. Effects of short term feeding of some marine microalgae on the microbial profile associated with *Dicentrarchus labrax* post larvae. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, Alexandria, v. 40, p. 251-260, Oct 2014.

ERTOR, I. E ORTEGA-CERDA, M. Political lessons from early warnings: *Marine finfish* aquaculture conflicts in Europe. **Marine Policy**, Amsterdam, v. 51, p. 202-210, Sep 2015.

EVANS, L.; HENNIGE, S. J.; WILLOUGHBY, N.; ADELOYE, J. A.; SKROBLIN, M.; GUTIERREZ, T. Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, Amsterdam, v. 24, p. 368-377, 2017.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, n. 361, p. 14-15, 1996.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome, FAO, 197p. 2010.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome, FAO, 200p. 2016.

FARMAKI, G. E.; THOMAIDIS, N. S.; PASIAS, I. N.; BAULARD, C.; PAPAHRISIS, L.; EFSTAHIOU, C. E. Environmental impact of intensive aquaculture: Investigation on the accumulation of metals and nutrients in marine sediments of Greece. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 485-486, p. 554-562, Apr 2014.

FERNANDEZ-LINARES, L. C; BARAJAS, C. G.; PÁRAMO, E. D.; CORONA, J. A. B. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. **Bioresource Technology**, London, v. 244, p. 400-406, 2017.

FENG, D.; CHEN, Z.; XUE, S.; ZHAND, W. Increased lipid production of the marine

oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, London, v. 102, n. 12, p. 6710-6716, June 2011.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, London, v. 102, n. 1, p. 101-105, Jan 2011.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; DE REVIERS, B.; PRADO, J. F.; REZIG, S. H. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**, Porto Alegre: Artmed, v. 1, 332 p., 2010.

GAFFNEY, M.; O'ROURKE, R.; MURPHY, R. Manipulation of fatty acid and antioxidant profiles of the microalgae *Schizochytriumsp. throughflaxseed* oil supplementation. **Algal Research**, Amsterdam, v. 6, p. 195-200, May 2014.

GAO, C.; ZHAI, Y.; DING, Y.; WU, Q. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, Barking, v. 87, n. 3, p. 756-761, Mar 2010.

GEROGE, B.; PANCHA, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, London v. 171, p. 367-374, Aug 2014.

GJEDREM T.; ROBINSON N.; RYE M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 350-353, n. 1, p. 117-119, June 2012.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu. p. 601, 2011.

GOU, Z.; ZOU, X. Impact of discontinuous harvesting on fishery dynamics in a stock-effort fishing model. **Commun Nonlinear Sci Numer Simulat**, Beijing, v. 20, p. 594-603, Jul 2015.

GUERRERO-CABRERA, L.; RUEDA, J. A.; GARCIA-LOZANO, H.; NAVARRO, A. K. Cultivation of *Monoraphidium sp.*, *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* Algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. **Bioresource Technology**, London, v. 161, p. 455-460, 2014.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrate animal**, SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds.). New York: Plenum Publishing, p. 29-60, 1975.

HE P. J.; MAOA B.; SHEN C. M.; SHAO L. M.; LEE D. J.; CHANG J. S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. **Bioresource Technology**, London, v. 129, p. 177 - 181, Feb 2013.

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

294, 2017.

HERBECK, L., S.; SOLLICH, M.; UNGER, D.; HOLMER, M.; JENNERJAHN, T. C. Impact of pond aquaculture effluents on seagrass performance in NE Hainan, tropical China. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 85, p. 190-203, Jun 2014.

HERNADEZ, J-P.; de BASHAN, L. E.; RODRIGUEZ, D. J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, n. 1, p. 88-93, Jan 2009.

HUANG, Y.; HUANG, Y.; LIAO, Q.; FU, Q.; XIA, A.; ZHU, X. Improving phosphorus removal efficiency and *Chlorella vulgaris* growth in high-phosphate MFC wastewater by frequent addition of small amounts of nitrate. **International journal of hydrogen energy**, Oxford, v. 42, p. 27749-27758, 2017.

JERONIMO, C. E.; BALBINO, C. P. caracterização físico-química de efluentes da carcinicultura e seus impactos ao meio ambiente. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 8, n. 8, p. 1639-1650, Dez 2012.

JU, Z. Y.; DENG, D. F.; DOMINY, W. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fish meal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 354-355, p. 50-55, May 2012.

KARIMANZIRA, D.; JACOBI, M.; PFUETZENREUTER, T.; RAUSCHENBACH, T.; EICHHORN, M.; TAUBERT, R.; AMENT, C. First testing of an AUV mission planning and guidance system for water quality monitoring and fish behavior observation in net cage fish farming. **Information processing in agriculture**, Beijing, v. 1, p. 131-140, Dec 2014.

KIM, J.; LINGARAJU, B. P.; RHEAUME, R.; LEE, J-Y.; SIDDIQUI, K. F. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, Beijing, v. 15, n. 4, p. 391-396, Aug 2010.

KOBAYASHI, N.; NOEL, E. A.; BARNES, A.; WATSON, A.; SOSENBERG, J. N.; ERICKSON, G.; OYLER, G. A. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. **Bioresource Technology**, London, v. 150, p. 377-386, 2013.

KUBTIZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 124, p.10-19, Mar 2011.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, K. S. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, London, v. 101, n. 15, p. 6012-6018, Aug 2010.

LAM, K. M.; YUSOFF, M. I.; UEMERA, Y.; LIM, J. W.; KHOO, C. G.; LEE, K. T.; ONG, H. C. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for

biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. **Renewable Energy**, Oxford, v. 103, p. 197-207, 2017.

LANANAN, F.; HAMID, S. H. A.; DIN, W. N. S.; ALI, N. KHATOON, H.; JUSOH, A.; ENDUT, A. Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 95, p. 127-134, Jul 2014.

LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, London, v. 186, p. 246-251, 2015.

LI C.; YANG H.; XIA X.; LI Y.; CHEN L.; ZHANG M.; ZHANG L.; WANG. High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. **Bioresource Technology**, London, v. 127, n. 1, p. 248 – 255, Jan 2013a.

LI C.; YANG H.; LI Y.; CHEN L.; ZHANG M.; ZHANG L.; WANG. Novel bioconversions of municipal effluent and CO₂ into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. **Bioresource Technology**, London, v. 132, n. 1, p. 171 – 177, March 2013b.

LI, Y.; CHEN, Y-F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, London, v. 102, n. 8, p. 5138-5144, Apr 2011.

LIAO, Q.; SUN, Y.; HUNAG, Y.; XIA, A.; FU, Q.; ZHU, X. Simultaneous enhancement of *Chlorella vulgaris* growth and lipid accumulation through the synergy effect between light and nitrate in a planar waveguide flat-plate photobioreactor. **Bioresource Technology**, London, v. 243, p. 528-538, 2017.

LIU, X.; YING, K.; CHEN, G.; ZHOU, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; CAI, Z.; HOLMES, T.; TAO, Y. Growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbon dioxide. **Chemosphere**. Oxford, v. 186, p. 977-985, 2017.

LIU, Z. Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, London, v. 99, n. 11, p. 4717-4722, July 2008.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**, São Carlos: Rima, v. 1, p. 295-315, 2006.

MARINHO-SORIANO E.; AZEVEDO C. A. A.; TRIGUEIRO T. G.; PEREIRA D. C.; CARNEIRO M. A. A.; CAMARA M. R. Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and Artemia. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 65, n. 1, p. 253-257, Jan. 2011.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 10, p. 3389–3401, Oct 2011.

MEDEIROS, D. C.; AZEVEDO, C. M.; MARQUES, L. C.; SOUSA, R. A.; OLIVEIRA, C. J. Qualidade de mudas de tomate em função do substrato e irrigação com efluente de piscicultura. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 170-175, 2013.

McDONOUGH, S.; GALLARDO, W.; BERG, H.; TRAI, N. V.; YEN, N. Q. Wetland ecosystem service values and shrimp aquaculture relationships in Can Gio, Vietnam. **Ecological Indicators**, New York, v. 43, 201-213, Jun 2014.

MIAO, M. S.; YAO, X. D.; SHU, L.; YAN, Y. J.; WANG, Z.; LI, N.; CUI, X. T.; LIN, Y. M.; KONG, Q. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 113, p. 120-125, 2016.

MILLEDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Rev Environment Science Biotechnology**, Dordrecht, v. 10, p. 31-41, 2011.

MOHAN, S. V.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, R.; NAVANEETH B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, London, v. 184, p. 169-178, Nov 2015.

MOHD-SAHIB, A. A.; LIM, J. W.; LAM, M. K.; UEMERA, Y.; ISA, M. H.; HO, C. D.; KUTTY, S. R. M.; WONG, C. Y.; ROSLI, S. S. Lipid for biodiesel production from attached growth *Chlorella vulgaris* biomass cultivating in fluidized bed bioreactor packed with polyurethane foam material. **Bioresource Technology**, London, v. 239, p. 127-136, 2017.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, Amsterdam, v. 48, n. 7, p. 2169-2173, July 2007.

MUNGKUNG, R.; AUBIN, J.; PRIHADI, T. H.; SLEMBROUCK, J.; WERF, H. M. G.; LEGENDRE, M. Life Cycle Assessment for environmentally sustainable aquaculture management: a case study of combined aquaculture systems for carp and tilapia. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 57, p. 249-256, Jun 2013.

MUTJABA, G.; LEE, K. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. **Water Research**, Oxford, v. 120, p.174-184, 2017.

MUTJABA, G.; RIZWAN, M.; LEE, K. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Seoul, v. 49, p. 145-151, 2017.

NAGARAJ, S.; RAJARAM, M. G.; ARULMURUGAN, P.; BASKARABOOPATHY, A.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; RENGASAMY, R. Antiproliferative potential of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* Flotow on human hepatic cancer (HepG2) cell line. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, Amsterdam, v. 2, p. 149-153, Mar 2012.

NEDBAL L.; TRTÍLEK M.; CERVENY J.; KOMÁREK O.; PAKRASI H.B. A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 100 n. 5, p. 902–910, 2008.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, Florianopolis, v. 21, n. 2, p. 7-18, jun 2008.

PANT, J.; BARMAN, B. K.; JAHAN, K. M.; BELTON, B.; BEVERIDGE, M. Can aquaculture benefit the extreme poor? A case study of landless and socially marginalized Adivasi (ethnic) communities in Bangladesh. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 418-419, p. 1-10, Oct 2014.

RAEESOSSADATI, M. J.; AHMADZADEH, H.; McHENRY, M. P.; MOHEIMANI, N. R. CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. **Algal Research**, Amsterdam, v. 6, p. 78-85, Sep 2014.

RAY, N. E.; TERLIZZI, D. E.; KANGAS, P. C. Nitrogen and phosphorus removal by the Algal Turf Scrubber at an oyster aquaculture facility. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 78, p. 27-32, May 2015.

RICHARDS R.G.; MULLINS B.J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 249, n. 24, p. 59-67, Jan 2013.

RINCON, M. S.; ROMERO, H. M.; AFRAMEHR, W. M.; BEYENAL, H. Biomass production in *Chlorella vulgaris* biofilm cultivated under mixotrophic growth conditions. **Algal Research**, Amsterdam, v. 26, p. 153-160, 2017.

RUIZ-MARTINEZ A.; MARTIN GARCIA N.; ROMERO I.; SECO A.; FERRER J. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. **Bioresource Technology**, London, v. 126, p. 247-253, Dec 2012.

RYCKEBOSCH, E.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 160, p. 393-400, Mar 2014.

SAMORÌ G.; SAMORÌ C.; GUERRINI F.; PISTOCCHI R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, Oxford, v. 47, n. 2, 1, p. 791-801, Feb 2013.

SHEN, Q. H.; GONG, Y. P.; FANG, W. Z.; BI, Z. C.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; CHEN, H. L. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. **Bioresource Technology**, London, v. 193, p. 68-75, 2015.

- SHIN, D. Y.; CHO, H. U.; UTOMO, J. C.; CHOI, Y.; XU, X.; PARK, J. M. Biodiesel production from *Scenedesmus bijuga* grown in anaerobically digested food wastewater effluent. **Bioresource Technology**, London, v. 184, p. 215-221, Oct 2015.
- SILVA, B. F. WENDT, E. V.; CASTRO, J. C.; OLIVEIRA, A. E.; CARRIM, A. J. I.; VIEIRA, J. D. G.; SASSI, R.; SASSI, C. F. C.; SILVA, A. L. V.; BARBOZA, G. F. O.; FILHO, N. R. A. Analysis of some chemical elements in marine microalgae for biodiesel production and other uses. **Algal Research**, Amsterdam, v. 9, p. 312-321, Apr 2015.
- SILVA, J. W. A. **Teor lipídico da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada com diferentes quantidades de nitrato de sódio**. Monografia 46 f. 2011 (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2011.
- SILVA, J. W. A. **Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica**. 48 f. 2013 Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2013.
- SILVA, J. W. A.; ARAUJO, G. S.; COELHO, A. A. C.; BEZERRA, J. H. C.; LOPES, D. N. M.; FARIAS, W. R. L. Effect of nitrate depletion on lipid accumulation by the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, n. especial, p. 811–816, 2015.
- SUBHADRA, B, EDWARDS, M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. **Energy Policy**, Guildford, v. 38, n. 9, p. 4897-902, Sep 2010.
- SUH, S. S.; KIM, S. J.; HWANG, J.; PARK, M.; LEE, T. K.; KIL, E. J.; LEE, S. Fatty acid methyl ester profiles and nutritive values of 20 marine microalgae in Korea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, p. 191-196, Mar 2015.
- SYDNEY, E. B.; SILVA, T. E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A. C.; CARVALHO, J. C.; WOICIECOHWSKI, A. L.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 10, p. 3291-3294, Oct 2011.
- TAHMASEBI, A.; KASSIM, M. A.; YU, J.; BHATTACHARYA, S. Thermogravimetric study of the combustion of *Tetraselmis suecica* microalgae and its blend with a Victorian brown coal in O₂/N₂ and O₂/CO₂ atmospheres. **Bioresource Technology**, London, v. 150, p. 15-27, Oct 2013.
- TEIXEIRA-LOPES, M. A.; VIEIRA-GIRÃO, P. R. N.; FREIRE, J. E. C.; ROCHA, I. R. C. B.; COSTA, F. H. F.; RÁDIS-BAPTISTA, G. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 312, p. 212-216, Jan 2011.
- TSUKUDA, S; CHRISTIANSON, L; KOLB, A; SAITO, K; SUMMERFELT, S. Heterotrophic denitrification of aquaculture effluent using fluidized sand biofilters. **Aquacultural Engineering**, London, v. 64, p. 49-59, Nov 2015.

URI, P.; TATYANA, Z.; MEIRA, W. Accumulation of triglycerides in green microalgae: a potential source for biodiesel. **Federation of European Biochemical Societies**, West, Sussex, v. 277, n. 1, p. 5–36, Jan 2010.

VARGAS, R. M. **Transesterificação de óleos vegetais, catalisada por bases não-iônicas, em fases homogênea e heterogênea**. 1996. 135 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 1996.

WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, London, v. 102, p. 2724-2730, 2011.

WANG, H. M.; PAN, J. L.; CHEN, C. Y.; CHIU, C. C.; YANG, M. H.; CHANG, H. W.; CHANG, J. S. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochemistry**, Barking, v. 45, n. 12, p. 1865-1872, Dec 2010.

WANG, Y.; GUO, W.; YEN, H.W.; HO, S.H.; LO, Y. C.; CHENG, C. L.; REN, N.; CHANG, J. S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. **Bioresource Technology**, London, v. 198, p. 619-625, 2015.

WEN, Y.; HE, Y.; JI, X.; LI, S.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; WANG, M.; CHEN, B. Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage. **Bioresource Technology**, London, v. 243, p. 247-253, 2017.

WILKIE, M. P.; STECYK, J. A. W.; COUTURIER, C. S.; SIDHU, S.; SANDVIK, G. K.; NILSSON, G. E. Reversible brain swelling in crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius auratus*) in response to high external ammonia and anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Los Angeles, Part A, v. 184, p. 65-75, Jan 2015.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of environmental engineering**, New York, v. 135, n. 11, p. 1115-1122, Nov 2009.

YEESANG, C.; CHEIRSILP, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technology**, London, v. 102, n. 3, p. 3034-3040, Feb 2011.

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

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHEN, X. D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, Aug 2011.

ZNAD, H.; KETIFE, A. M. D.; JUDD, S.; ALMOMANI, F.; VUTHALURU, H. B.
Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 110, p. 1-7, 2017.