

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO ALEXANDRE SILVEIRA DA SILVA

BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE UTILIZANDO *Tetrademus obliquus*  
IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA

CURITIBA

2022

PAULO ALEXANDRE SILVEIRA DA SILVA

BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES UTILIZANDO *Tetrademus obliquus*  
IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, Linha de Pesquisa em Energias Renováveis e não Renováveis, e Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Silva, Paulo Alexandre Silveira da.

Biorremediação de efluentes utilizando *Tetrademus obliquus* imobilizada em matriz de alginato e quitosana. / Paulo Alexandre Silveira da Silva. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano.

1. Microalgas. 2. Águas residuais - Tratamento. 3. Alginatos. 4. Quitosana. I. Mariano, André Bellin. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. III. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Júnior CRB-9/1797

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **PAULO ALEXANDRE SILVEIRA DA SILVA** intitulada: **Biorremediação de efluentes utilizando *Tetrademus obliquus* imobilizada em matriz de alginato e quitosana**, sob orientação do Prof. Dr. ANDRE BELLIN MARIANO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

12/04/2022 08:23:16.0

ANDRE BELLIN MARIANO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/04/2022 09:42:47.0

JOSE VIRIATO COELHO VARGAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/04/2022 09:24:07.0

RAFAEL BRUNO VIEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível, sendo eternamente grato por me ajudar a trilhar esse caminho de estudo e pesquisa.

Aos familiares, em especial meus pais, pelo amor incondicional e por serem minha fortaleza, me dando apoio e me aconselhando em todos os momentos, estando sempre presentes e com tamanha compreensão, minha gratidão.

Aos amigos, que além de me aconselharem, sempre dispostos a me ajudando com os estresses da vida acadêmica.

Ao NPDEAS e a UFPR, pela infraestrutura, o qual permitiu a realização do projeto e me permitiu trabalhar em uma área incrível, conhecendo pessoas maravilhosas. À Beatriz, ao Rafael e a Rafaela, que trabalharam ativamente no projeto como alunos de iniciação científica, contribuindo na obtenção dos resultados do projeto.

À Paula, que se prontificou a me ajudar, realizando a técnica de microscopia em um momento de pandemia, onde os laboratórios especializados estavam inoperantes.

A lhana, que me convidou para uma colaboração, me permitindo publicar a revisão literária do presente trabalho em formato de capítulo de livro, além de ter trilhado e desbravado comigo os caminhos da prospecção e redação de patente.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> André, pela sua orientação, compreensão e confiança, me encorajando a realizar os desafios do projeto.

Aos membros da banca, Prof<sup>o</sup> José Vargas e Prof<sup>o</sup> Rafael Bruno, por aceitaram o convite e pelas valiosas contribuições.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, em especial a secretaria, a Neiva, por sempre estar em prontidão para resolver os problemas e tirar as dúvidas durante o período do mestrado.

Agradeço a Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro, o qual foi essencial para realização de todo o projeto.

Em geral, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, ou estiveram comigo durante esta trajetória.

## RESUMO

O aumento da contaminação da água e a formação de águas residuais vem aumentando com o tempo, devido ao crescimento progressivo da população e a deficiência na captação da coleta de esgoto. O tratamento convencional de efluentes realizado pelas estações de tratamento de águas, apresentam grandes índices de ineficiência, não chegando ao tratamento mínimo exigido pelo CONAMA, logo, novas tecnologias de tratamento de efluentes devem ser implantadas. O objetivo deste trabalho, consiste em estudar o processo de imobilização da *Tetrademus obliquus* por encapsulamento em matriz de alginato e quitosana, e avaliar o seu potencial como agente biorremediador. Além de contemplar todo processo de implementação tecnológica a partir da investigação do estado da arte em acervos abertos de propriedade intelectual, e propor um processo biotecnológico patenteável utilizando o sistema de imobilização e o cultivo de microalgas imobilizadas.

**Palavras-chave:** Microalgas, Tratamento de Águas Residuais, Fotobiorreatores, Imobilização celular.

## ABSTRACT

The increase in water contamination and the formation of wastewater has been increasing over time, due to the progressive growth of the population and the deficiency in the collection of sewage collection. The conventional treatment of effluents carried out by water treatment plants has high inefficiency rates, not reaching the minimum treatment required by CONAMA, therefore, new technologies for the treatment of effluents must be implemented. The objective of this work is to study the process of immobilization of *Tetradesmus obliquus* by encapsulation in alginate and chitosan matrix, and to evaluate its potential as a bioremediation agent. In addition to contemplating the entire process of technological implementation from the investigation of the state of the art in open collections of intellectual property, and proposing a patentable biotechnological process using the immobilization system and the cultivation of immobilized microalgae.

**Palavras-chave:** Microalgae, Wastewater treatment, Photobioreactors, Cell immobilization.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

FIGURA 1 - CORRELAÇÕES ENTRE A DEMANDA DE FONTES DE ENERGIA E CARBONO COM O TIPO DE CULTIVO DE MICROALGAS. ....	15
FIGURA 2 - FOTOBIORREATORES TUBULARES COMPACTOS DE LARGA ESCALA PARA CULTIVO DE MICROALGAS NO NPDEAS (CURITIBA, PARANÁ, BRASIL). ....	28
FIGURA 3 - SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROALGAS. ....	30

### CAPITULO 2

FIGURA 1 – MICROALGAS IMOBILIZADAS EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA. ....	55
FIGURA 2 - MICROALGAS IMOBILIZADAS EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA CULTIVADAS EM MEIO CHU). ....	56
FIGURA 3 - MICROSCOPIA ÓPTICA DE MICROALGA IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE CULTIVO NO REATOR 1, AUMENTO EM 400X. ....	58
FIGURA 4 – MICROSCOPIA ÓPTICA DE MICROALGA IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE CULTIVO NO REATOR 2, AUMENTO EM 400X. ....	59
FIGURA 5 – MICROSCOPIA ÓPTICA DE MICROALGA IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE CULTIVO NO REATOR 3, AUMENTO EM 400X. ....	60
FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA NOS REATORES EM FUNÇÃO DO TEMPO. ....	61
FIGURA 7 – CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE MICROALGA NOS REATORES EM FUNÇÃO DO TEMPO. ....	62
FIGURA 8 – AUMENTO DO PH EM FUNÇÃO DO TEMPO DECORRIDO NO CULTIVO. ....	63
FIGURA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE CRESCIMENTO CELULAR E A DE REDUÇÃO DO FOSFATO NO MEIO. ....	64
FIGURA 10 – CURVA DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO ACUMULADA DE	

FOSFATO AO LONGO DO CULTIVO. ....	65
FIGURA 11 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE DA MICROESFERA DE ALGINATO E QUITOSANA. ....	66
FIGURA 12 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO CORTE LATERAL DA ESFERA DE MICROALGA IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO E QUITOSANA.....	67
FIGURA 13 – TESTE DE VIABILIDADE DAS MICROESFERAS DE ALGINATO E QUITOSANA APÓS 5 MESES.....	68
FIGURA 14 – ESFERAS DE MICROALGA IMOBILIZADA EM ALGINATO APÓS 10 MESES.....	69
FIGURA 15 – TESTE DE VIABILIDADE DAS MICROESFERAS DE ALGINATO APÓS 10 MESES.....	70

### CAPITULO 3

FIGURA 1 - COMBINAÇÕES ENTRE OS CÓDIGOS DE CLASSIFICAÇÃO DE PATENTES .....	81
FIGURA 2 - EVOLUÇÃO DO DEPÓSITO DE PATENTES NOS ÚLTIMOS ANOS .....	82
FIGURA 3 - NÚMERO DE DOCUMENTOS POR PAÍS.....	83
FIGURA 4 - PRINCIPAIS DEPOSITANTES.....	83

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

TABELA 1 - RELAÇÃO ENTRE NUTRIENTES E FUNÇÕES METABÓLICAS....	19
TABELA 2 - TAXAS DE REMOÇÃO DE POLUENTES PRESENTES EM DIFERENTES ÁGUAS RESIDUAIS E CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DE MICROALGAS EM PROCESSOS DE TRATAMENTO.....	22
TABELA 3 - TRATAMENTO DE RESÍDUOS POR MICROALGAS IMOBILIZADAS. .....	29
TABELA 4 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DE DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO DA CULTURA CELULAR.....	33
TABELA 5 - BIOCOMBUSTÍVEIS PRODUZIDOS POR BIOMASSA E PROCESSO DE MICROALGA.....	36

### CAPITULO 2

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO CHU MODIFICADO.....	52
---	----

### CAPITULO 3

TABELA 1 – CÓDIGOS DE PROSPECÇÃO DE PATENTES.....	80
---	----

## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
<b>1. CAPÍTULOS .....</b>	<b>13</b>
1.1 <b>ARTIGO 1 - FICORREMEDIAÇÃO: O PAPEL DAS MICROALGAS NA GESTÃO DE RESÍDUOS E PRODUÇÃO DE ENERGIA.....</b>	13
1.2 <b>ARTIGO 2 – IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGA PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES .....</b>	49
1.3 <b>ARTIGO 3 – MATRIZES POLIMÉRICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGAS APLICADAS AO TRATAMENTO DE EFLUENTES: UMA ANÁLISE DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES .....</b>	75
1.4 <b>ARTIGO 4 – FOTOBIORREATOR MODULAR HÍBRIDO (TERRA-ÁGUA) E/OU CARTUCHOS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS LIVRES OU IMOBILIZADAS EM BIOPOLÍMEROS APLICADO NO PROCESSO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES, GERAÇÃO DE PRODUTOS E SEUS USOS .....</b>	89
<b>2 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>

## SUMÁRIO DETALHADO

<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. CAPÍTULOS</b> .....	<b>13</b>
<b>ARTIGO 1 - FICORREMEDIAÇÃO: O PAPEL DAS MICROALGAS NA GESTÃO DE RESÍDUOS E PRODUÇÃO DE ENERGIA</b> .....	<b>13</b>
<b>1. MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO: VISÃO GERAL</b> ....	<b>13</b>
1.1 LUZ.....	15
1.2 TEMPERATURA.....	17
1.3 PH.....	17
1.4 AERAÇÃO E AGITAÇÃO .....	18
1.5 NUTRIENTES.....	18
<b>2. FICORREMEDIAÇÃO</b> .....	<b>19</b>
2.1 O PAPEL DAS MICROALGAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES ....	20
2.2 LAGOAS FACULTATIVAS .....	24
2.3 SISTEMAS DE LODO ATIVADOS .....	25
2.4 <i>SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS</i> .....	26
<b>3. SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO BIOLÓGICA</b> .....	<b>28</b>
3.1 ADESÃO OU ADSORÇÃO .....	30
3.2 AUTOIMOBILIZAÇÃO .....	31
3.3 APRISIONAMENTO DENTRO DA MATRIZ.....	31
3.4 CÉLULAS CONTIDAS ATRÁS DE UMA BARREIRA.....	32
<b>4. CULTIVO DE MICROALGAS IMOBILIZADAS</b> .....	<b>32</b>
4.1 FOTOBIORREACTORES DE LEITO FLUIDIZADO .....	34
4.2 FOTOBIORREACTORES DE BIOFILME.....	35
<b>5. BIOENERGIA A PARTIR DE MICROALGAS</b> .....	<b>35</b>
5.1 BIODIESEL.....	36
5.2 BIOETANOL .....	38
5.3 BIOMETANO E BIOHIDROGÊNIO.....	38
5.4 BIOBUTANOL.....	39
<b>6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>39</b>
<b>ARTIGO 2 – IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGA PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES</b> .....	<b>49</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>

2.1 JUSTIFICATIVA.....	51
2.2 OBJETIVO GERAL.....	51
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>52</b>
3.1 CULTIVO DE MICROALGAS .....	52
3.2 IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGAS .....	53
3.3 POTENCIAL BIORREMEIADOR .....	53
3.4 BIOMASSA SECA .....	54
3.5 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	54
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	54
3.7 TESTE DE DURABILIDADE.....	54
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
4.1 IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGAS .....	54
4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	56
4.3 BIOMASSA.....	61
4.4 POTENCIAL BIORREMEIADOR .....	63
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	65
4.6 TESTE DE VIABILIDADE .....	67
<b>5 RESULTADOS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL .....</b>	<b>70</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7 REFERENCIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>ARTIGO 3 – MATRIZES POLIMÉRICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGAS APLICADAS AO TRATAMENTO DE EFLUENTES: UMA ANÁLISE DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES .....</b>	<b>75</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>2. PRINCIPAIS MATRIZES UTILIZADAS NA IMOBILIZAÇÃO CELULAR: UMA BREVE REVISÃO .....</b>	<b>77</b>
2.1 QUITOSANA.....	78
2.2 ALGINATO.....	79
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>79</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>5 DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>84</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>ARTIGO 4 – FOTOBIORREATOR MODULAR HÍBRIDO (TERRA-ÁGUA) E/OU CARTUCHOS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS LIVRES OU IMOBILIZADAS EM BIOPOLÍMEROS APLICADO NO PROCESSO DE</b>	

TRATAMENTO DE EFLUENTES, GERAÇÃO DE PRODUTOS E SEUS USOS .....	89
<b>1. CAMPO DA INVENÇÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>2. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E DECLARAÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA.....</b>	<b>89</b>
<b>3. DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO .....</b>	<b>94</b>
<b>4. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>5. EXEMPLOS.....</b>	<b>101</b>
<b>6. REINVINDICAÇÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>2 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>

## 1. CAPÍTULOS

Essa seção apresenta a revisão bibliográfica e os resultados em forma de artigos publicados e não publicados, desenvolvidos durante o período do mestrado.

### 1.1 **ARTIGO 1 - FICORREMEDIAÇÃO: O PAPEL DAS MICROALGAS NA GESTÃO DE RESÍDUOS E PRODUÇÃO DE ENERGIA**

Springer Nature Switzerland AG 2022 A. E.-F. Abomohra et al. (eds.), Waste-to-Energy,

ISBN 978-3-030-91569-8 /ISBN 978-3-030-91570-4 (eBook)

[https://doi.org/10.1007/978-3-030-91570-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-91570-4_17)

#### **Resumo**

O descarte indiscriminado de resíduos industriais agravou os problemas de poluição ambiental e é uma preocupação iminente para as instalações industriais. Essas questões podem ser contornadas por técnicas convencionais de tratamento de efluentes, no entanto, existem vários gargalos associados que os tornam pouco atraentes. Diante desse cenário, a fitorremediação pode ser uma alternativa e estão sob escrutínio de pesquisadores, desenvolvedores e industrialistas. Os processos mediados por microalgas são uma abordagem promissora para a remoção direta de compostos poluentes e resíduos, como matéria orgânica, fósforo e nitrogênio. As microalgas também são responsáveis pela produção de biomassa e obtenção de diversos bioprodutos valiosos. No entanto, alguns fatores são limitantes na escolha do sistema de cultivo de microalgas, como a recuperação da biomassa. Assim, a adoção de técnicas de imobilização celular pode ser uma opção econômica e ambientalmente favorável para a remoção de resíduos de efluentes. Nesse sentido, o objetivo deste capítulo é apresentar o papel das microalgas na gestão de resíduos e na produção de energia como agentes de fitorremediação. Os principais destaques do capítulo incluem uma visão geral das condições de microalgas e cultura, fitorremediação, microalgas em sistemas de tratamento de águas residuais, sistemas biológicos de imobilização e o cultivo de microalgas imobilizadas. Finalmente, os potenciais produtos de bioenergia de microalgas e algumas recomendações são introduzidos e discutidos.

#### **1. Microalgas e condições de cultivo: Visão geral**

As microalgas são microrganismos clorofilados, eucarióticos ou procarióticos, responsáveis por aproximadamente metade de todo o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) fixado na Terra. Na presença da luz solar, esses microrganismos

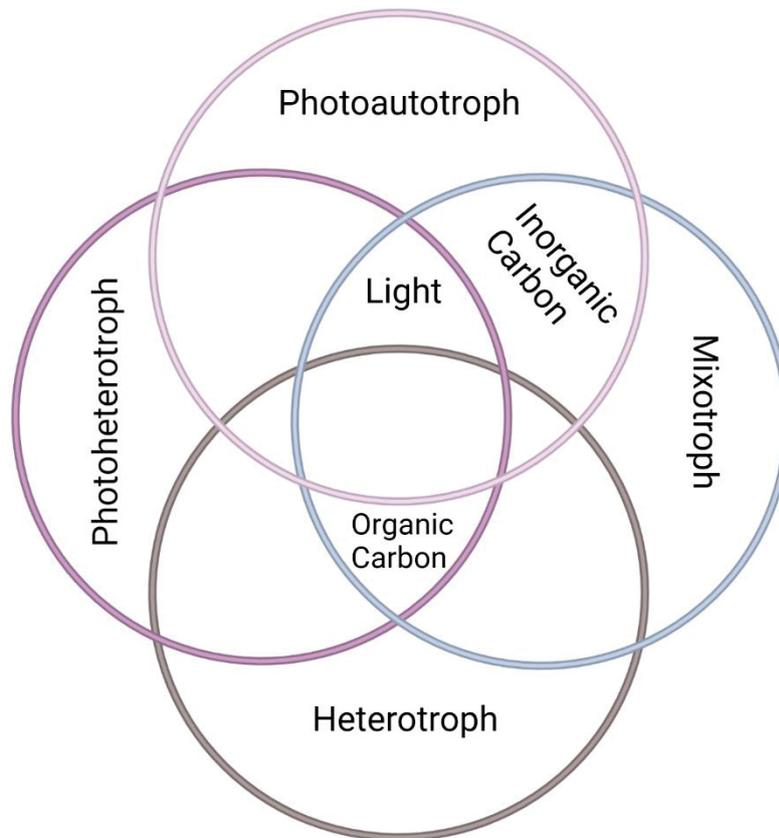
são capazes de converter CO<sub>2</sub> (carbono inorgânico presente na atmosfera) e água em oxigênio e biomassa através da fotossíntese. Como produtores primários, as microalgas são a base da cadeia alimentar oceânica, existem mais de 500 mil espécies, que desempenham um papel muito importante na ecologia, e cada vez mais para a biotecnologia (Borowitzka et al. 2016; Sajjadi et al. 2018).

Esses microrganismos distintos podem ser facilmente encontrados em diferentes ambientes, como rios, lagos e oceanos. Além disso, devido à sua rápida taxa de crescimento, elas podem prosperar em água salina e não potável, sem a necessidade de um meio rico em nutrientes, e requerem uma área relativamente pequena para seu crescimento (Gouveia e Oliveira 2009). Essas vantagens permitem grande aplicabilidade comercial desses microrganismos, atraindo assim o interesse de pesquisadores e indústrias, em áreas como farmácia, engenharia química, biologia, meio ambiente e energia (Daneshvar et al. 2021).

Geralmente, as microalgas são cultivadas em regime foto-autotrófico, mas podem ser cultivadas também em meios foto-heterotrófico, heterotrófico e mixotrófico, dependendo da luminosidade e fonte de carbono a que são submetidas (Figura 1). Em condições foto-autotróficas, as microalgas requerem carbono inorgânico, e luz como fontes de energia. No entanto, se o carbono fornecido é orgânico, na presença da luz, é assim chamado foto-heterotrófico. Em condições heterotróficas não há fonte de luz, toda a energia necessária para o crescimento é fornecida por uma fonte de carbono exógena de origem orgânica. Por fim, se há uma fonte de luz e o meio é suplementado com carbono orgânico e inorgânico, é chamado de mixotrófico (Verma et al. 2020).

Figura 1 - Correlações entre a demanda de fontes de energia e carbono com o

tipo de cultivo de microalgas.



Fonte: Da Silva et al. (2022)

Devido às múltiplas diversidades metabólicas das microalgas, a elucidação das rotas preferenciais de assimilação de carbono e energia deve ser bem identificada para favorecer seu crescimento adequado e alcançar os resultados desejados. Associados a esses aspectos, vários fatores operacionais e parâmetros de processo influenciam o desempenho bem-sucedido dos cultivos microalgais e, portanto, a composição final da biomassa (Richmond 2004). Esses fatores foram amplamente estudados ao longo dos anos e serão apresentados e discutidos abaixo.

### 1.1 Luz

O cultivo de microalgas apresenta uma demanda única em biotecnologia industrial, que é o fornecimento adequado de luz para as células. Essa característica modifica substancialmente a configuração dos biorreatores para produção microalgal (Sivakaminathan et al. 2018).

A luz é a principal fonte de energia para culturas foto-dependentes, a qual é convertida pelo sistema fotossintético das microalgas em energia química. Na

natureza, a fonte primária de energia é a radiação solar, mas em condições de laboratório, pode ser substituída por lâmpadas fluorescentes ou Diodos Emissores de Luz (LEDs) (Prajapati et al. 2013). A luz é um fator crítico para o cultivo e pode ser caracterizada por três parâmetros: intensidade, comprimento de onda e fotoperíodos.

A intensidade luminosa é definida pela quantidade de luz recebida em uma superfície em um determinado tempo e tem uma relação direta com a taxa fotossintética, resultando em uma curva com três fases: foto-limitação, foto-saturação e foto-inibição. A foto-limitação (até  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) é uma fase de baixo desenvolvimento microalgal devido ao simples fato de que não há luz suficiente para realizar fotossíntese e crescimento celular. Pode acontecer quando a cultura tem uma densidade celular elevada, evitando, portanto, que a luz penetre dentro do meio, ou quando não há luz suficiente. A foto-saturação (até  $300\text{-}1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) é o estágio ideal para o cultivo, pois há um aumento na taxa de crescimento celular. Na foto-inibição (acima de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), o sistema fotossintético de microalgas é danificado, resultando no crescimento celular baixo e, portanto, na morte do cultivo (Straka e Rittmann 2018; Daneshvar et al. 2021).

O espectro de radiação da luz solar é formado por incontáveis comprimentos de ondas, no entanto, as microalgas geralmente só são capazes de usar a faixa de 400 - 700 nm da luz visível, considerada a radiação fotossintética ativa (PAR). O comprimento de onda ideal é definido pelos pigmentos presentes nos fotossistemas, considerando que cada espécie de microalgas pode ter diferentes tipos deles. As principais são Clorofila *a* (presente em todas as microalgas) e Clorofila *b* (665 e 650 nm, respectivamente), *Xanthophyll* (500-550 nm) e *Phycoerythrin* (490 – 650 nm) (Borowitzka et al. 2016; Nwoba et al. 2019).

Finalmente, o fotoperíodo desempenha um papel fundamental no crescimento e distribuição de microalgas em larga escala, embora os requisitos variem amplamente entre as espécies, densidade celular e condições de cultivo. O fotoperíodo é definido pelo ciclo de exposição da cultura à luz através do tempo. Em condições foto-autotróficas, o crescimento celular está relacionado à luz:ciclos escuros (Che et al. 2019). Segundo alguns estudos, variações no fotoperíodo e intensidade de luz influenciam a composição bioquímica da

biomassa. Como exemplo, ciclos de luz de 12:12h (claro:escuro) causaram níveis de lipídios acima de 70% (George et al. 2014). Isso significa que a exposição máxima à luz não produz resultados máximos em todas as espécies de microalgas, no entanto, o fotoperiodismo deve ser otimizado dependendo do sistema de cultivo.

## **1.2 Temperatura**

A temperatura é outro fator crítico associado ao cultivo de microalgas. Determinante na biodisponibilidade de certos nutrientes, como na solubilidade de fontes inorgânicas de nitrogênio, tendo um impacto direto na taxa de crescimento dos microrganismos. Além disso, este parâmetro também pode produzir alterações bioquímicas na estrutura celular, na formação e qualidade de lipídios de microalgas (Yuan et al. 2020).

Em geral, a temperatura ideal para o cultivo ocorre na faixa de 25 a 35°C, embora algumas cepas possam suportar intervalos maiores, na faixa de 60°C, ou temperaturas de neve. Portanto, esse fator deve ser otimizado para cada processo e espécies, regulando a rapidez com que as reações podem ocorrer e determinando a taxa de crescimento. É importante ressaltar que a grande maioria dos sistemas de cultivo ao ar livre assume a variação de temperatura dependendo das condições climáticas locais. Assim, deve-se considerar o uso de sistemas externos de trocador de calor para o controle deste parâmetro (Schmidell et al. 2001; Barten et al. 2020; Daneshvar et al. 2021).

## **1.3 pH**

O pH é um aspecto altamente importante que impacta diretamente a atividade metabólica das microalgas. A solubilidade de cada composto no meio está sujeita a variações de pH, impactando assim a biodisponibilidade de carbono, fosfato e nitrogênio e transferência de gás. Em condições em que o pH > 9, pode ocorrer a inibição do crescimento e a volatilização da amônia (Lu et al. 2020; Rossi et al. 2020). Além disso, variações no pH além da faixa ideal (6 < pH < 9) podem alterar as características fisiológicas e morfológicas das microalgas e alterar a permeabilidade e seletividade da membrana celular, permitindo assim a passagem de íons e alteração da composição bioquímica

interna das células (Galès et al. 2020).

#### **1.4 Aeração e agitação**

A aeração é uma operação necessária no cultivo de microalgas, pois garante uma mistura uniforme nos biorreatores, favorecendo a exposição das células à luz, transferência de calor e troca de gás. Quando esse fator é ajustado corretamente, minimiza a formação de agregados celulares, o qual pode afetar o desempenho geral do bioreator (Zhao et al. 2011; Daneshvar et al. 2021). Além do papel principal de fornecimento de CO<sub>2</sub>, às vezes a aeração é responsável pela promoção da agitação nos casos em que impelidores e hélices não são permitidos ou são inviáveis. Normalmente, na parte inferior do tanque de cultura, são inseridos *spargers*, equipamentos com pequenos orifícios, responsáveis pela dispersão do ar no sistema. As bolhas formadas carregam energia mecânica, perturbando o meio de cultura através de seu caminho para a superfície, sendo uma solução ideal em culturas sensíveis a forças de cisalhamento significativas (Schmidell et al. 2001; Doran 2013).

#### **1.5 Nutrientes**

A biomassa microalgas é predominantemente composta de carbono, nitrogênio e fósforo, em proporções de aproximadamente 50, 8 e 1%, respectivamente. Assim, a disponibilidade desses nutrientes é essencial para sustentar o desempenho celular robusto nos bioreatores. Embora existam muitos elementos químicos presentes em ambientes aquáticos, sua distribuição não é homogênea. Assim, enquanto alguns compostos estão em altas concentrações (macronutrientes), outros têm baixa disponibilidade (micronutrientes). Há uma correlação entre nutrientes e sua importância no metabolismo celular (Tabela 1). Conseqüentemente, a deficiência nutricional pode causar vários problemas à cultura, como o aparecimento de células morfologicamente defeituosas, contendo baixas concentrações de amidos, lipídios e clorofila, ou mesmo impedindo seu crescimento dependendo de qual nutriente está em falta (Grobbelaar 2007; Borowitzka et al. 2016).

Tabela 1 - Relação entre nutrientes e funções metabólicas.

<b>Elemento</b>	<b>Funções</b>
<b>Macronutrientes</b>	
C	Componente estrutural das macromoléculas.
N	Componente estrutural de enzimas e proteínas.
P	Componente de ácidos nucleicos, fosfolipídios e regulação osmótica.
S	Componente estrutural de enzimas e proteínas.
K	Regulação osmótica.
Mg	Componente estrutural de clorofilas.
<b>Micronutrientes</b>	
Fe	Cofator para algumas reações enzimáticas e componentes do citocromo.
Mn	Transporte de elétrons e manutenção de cloroplastos.
Zn	Estrutura ribossômica, replicação de ácido nucleico e polimerização.
Com	Transporte de elétrons.
Co	Via metabólica da fotossíntese.
Mo	Redução de nitrogênio (redução de nitrato e nitrito para amônio).

Adaptado de: Grobbelaar (2007).

## 2. Fitorremediação

As microalgas têm sido utilizadas de várias formas, especialmente em aplicações de biotecnologia ambiental. A bioremediação é um ramo da biotecnologia, que aplica microrganismos ao tratamento ambiental, mas quando as microalgas são utilizadas, recebe a nomeação de fitorremediação (Emparan et al. 2019). O objetivo da fitorremediação é remover ou tratar contaminantes, e degradar ou transformar componentes tóxicos em espécies químicas não reativas. No que se refere às microalgas, este procedimento é realizado através de sua aplicação no consumo de nutrientes (por exemplo, nitrogênio e fósforo) em resíduos ou águas residuais para posterior produção de biomassa. O processo é realizado principalmente de três formas: (i) biossorção, (ii) biocoagulação e (iii) biodegradação.

A biossorção consiste no agregamento de compostos na superfície celular, permitindo a remoção dos contaminantes com recuperação de

biomassa. Durante o crescimento celular, alguns microrganismos, incluindo microalgas, são capazes de secretar substâncias extracelulares (ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e fosfolipídios), que podem precipitar. Os contaminantes são adsorvidos na cadeia polimérica e arrastados para fora da solução durante a decantação, o que resulta no processo de biocoagulação. A biodegradação baseia-se no rompimento das ligações químicas dos contaminantes, que são metabolizadas durante o crescimento celular, reduzindo o composto inicial em CO<sub>2</sub> (Anjaneyulu et al. 2005; Emparan et al. 2019; Sarkar e Dey 2021).

A título de exemplo, as algas são geralmente usadas em processos de degradação e descoloração de corantes têxteis. Diatomáceas porosas, como *Odontella aurita*, com estrutura e tamanho de 1-500 µm foram reportadas como agentes eficientes de biossorção no tratamento de efluentes ricos em corantes. Por outro lado, a alga verde do gênero *Spirogyra* tem sido aplicada para a biocoagulação do corante Amarelo Reativo 22 e Vermelho Ácido 274, com taxas de remoção superiores a 90%. As espécies cianobacterianas *Oscillatoria* e a microalga *Chlorella* são utilizadas em processos de biodegradação de corantes com agentes azo, como o Tectilon Yellow 2 G, produzindo anilina como composto intermediário, removendo quase 70% da cor (Sarkar e Dey 2021).

As vias metabólicas envolvidas na remoção de poluentes recalcitrantes, minimizando assim sua biodisponibilidade e toxicidade, dependem especialmente da produção de exopolímeros que podem adsorver compostos tóxicos na superfície celular e/ou complexar em formas menos biodisponíveis. O composto aderido à membrana ou parede celular das microalgas, pode permanecer nele ou ser internalizado e quelatado por moléculas pertencentes às classes de fitoquelatina (Dell' Anno et al. 2021).

## **2.1 O papel das microalgas no tratamento de efluentes**

O aumento da geração de águas residuais urbanas é um dos maiores desafios ambientais da atualidade. Os efluentes devem ser bem tratados para atingir um nível mínimo de segurança antes de serem descarregados em corpos d'água. O tratamento convencional de efluentes é realizado em estações de tratamentos, que são divididas em três etapas: tratamento primário, secundário

e terciário, implementando procedimentos físicos, biológicos ou químicos (Abdel-Raouf et al. 2012).

O tratamento primário é responsável pela remoção de sólidos suspensos por meio de processos físico-químicos, como floculação e decantação, que removem até 40% de toda materiais orgânicos em efluentes. O tratamento secundário utiliza principalmente processos biológicos para remover todos os compostos orgânicos e o máximo de matéria inorgânica possível, ricos em nitrogênio e fósforo. Quando não é possível remover todas as impurezas do efluente, requer um tratamento terciário através de processos químicos ou biológicos. Esta etapa do processo tem como alvo componentes específicos que ainda estão na água e envolvem a desnitrificação, onde o nitrato é reduzido a nitrito, assim, o nitrito será reduzido a gás nitrogênio que será liberado na atmosfera (von Sperling 2007a).

As águas residuais que necessitam de tratamento são constituídas principalmente por compostos orgânicos carbonáceos, determinados pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO), e inorgânicos, como fosfatos, amônio, bicarbonato, sódio, entre outros. Quando a matéria orgânica é o principal poluente é preferível usar tratamentos biológicos, pois são mais simples, eficientes e mais baratos quando comparados aos métodos físico-químicos (Mohsenpour et al. 2021).

O tratamento de resíduos à base de microalgas é particularmente atrativo devido às vantagens competitivas desses microrganismos na conversão de matéria orgânica e material inorgânico, como nitrogênio e fósforo responsáveis pela eutrofização, em biomassa para a produção de valiosos bioprodutos de interesse no mercado. O uso comercial das microalgas para biorremediação de efluentes não é novidade. Começou na década de 1950 e vem melhorando ao longo das décadas com pesquisas em várias plantas ao redor do mundo, para o tratamento secundário e terciário dos resíduos, utilizando-os como substratos. As principais fontes incluem resíduos agroindustriais, pecuária, esgoto doméstico e industrial (Lima et al. 2007; Lutz et al. 2021). A Tabela 2 resume as microalgas cultivadas em diferentes fontes de resíduos.

Tabela 2 - Taxas de remoção de poluentes presentes em diferentes águas residuais e crescimento de espécies de microalgas em processos de tratamento.

Espécie	Fontes de águas residuais	Processo de tratamento	Crescimento microalgal	Remoção de nutrientes	Referência
<i>Tetradlesmo obliquus</i>	Estrume suíno, esgoto doméstico e estrume de gado biodigerido	Fotobiorreator <i>airlift</i>	1.2, 0,75 e 0,85 g L <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 99,3% P: 99,2%	(Miyawaki et al. 2021)
<i>Artrospira platensis</i>	Águas residuais de laticínios	Lodo ativado	4.1 g L <sup>-1</sup>	COD: 98,4% PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 98,8% NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 99,6% NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : ~100%	(Hena et al. 2018)
<i>Hidrodictyon reticulatum</i>	Efluente de tratamento secundário	Lagoa <i>raceway</i>	1700 mg L <sup>-1</sup>	TN: 75,5% TP: 86%	(Min et al. 2021)
<i>Clamídonas mexicanas</i>	Águas residuais de suinocultura	Lodo ativado	0,56 g L <sup>-1</sup>	TN: 62% TP: 28% IC: 29% Ca: 33%	(Abou-Shanab et al. 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente de tratamento terciário	Esferas de alginato de sódio (escala de laboratório)	0.18 d <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : ~100% NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> : ~100% PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 90% TN: 90%	(Filippino et al. 2015)
	Esgoto do matadouro de aves	Esferas de alginato de sódio (escala de laboratório)	-	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 92,4, 72,3 e 65,5% PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> : 94,7, 76 e 67% NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 96,4, e 55,5%	(Hameed 2007)

<i>Chlorella sp.</i> e <i>Scenedesmus sp.</i>	Águas residuais municipais	Fotobiorreator de membrana	0,65 g L <sup>-1</sup>	TN: 40,1% TP: 95,8%	(Gao et al. 2014)
<i>Chlorella sp.</i> e <i>Phormidium sp.</i>	Efluente de porco anaerobicamente digerido	Lagoa raceway	800 e 1600 mg L <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1,97 g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> COD: 5,83 g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	(Moheimani et al. 2018)
<i>Chlorella sp.</i> e <i>Phormidium sp.</i>	Água cinza	Reator de biofilme de algas	3,64 g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 93% P: 88% COD: 80%	(Choudhary et al. 2017)
<i>Rubéola de halocloroala</i>	Efluente de tratamento secundário	Fotobiorreator de camada dupla	54 g m <sup>-2</sup> (6,3 g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 85% DEPOIS de 4 <sup>3-</sup> : 78,9% NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : 83%	(Shi et al. 2014)
<i>Tetraselmis suecica</i>	Águas residuais de piscicultura	Fotobiorreator tubular	0,75 e 1,0 g L <sup>-1</sup>	TN: 95,7% TP: 99,7%	(Michels et al. 2014)
<i>Cenadesmus sp.</i>	Efluente de tratamento secundário	Fotobiorreator tubular	2560, 1585 e 1661 mg L <sup>-1</sup>	TN: 42-95% TP: 16-100%	(Arbib et al. 2013)

\*(-): não apresentado; COD: demanda química de oxigênio; TN: nitrogênio total; TP: fósforo total; IC: carbono inorgânico; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: amônia; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrato; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito; Ca: cálcio.

Fonte: Da Silva et al. (2022)

## 2.2 Lagoas Facultativas

As lagoas de estabilização são os processos de tratamento de efluentes mais utilizados, que são baseadas em sistemas de tratamento natural das águas residuais. Existem muitos tipos de lagoas de estabilização, no entanto, a mais complexa e utilizada são as lagoas facultativas. As lagoas facultativas consistem em um conjunto de tratamentos aeróbicos e anaeróbicos que empregam o uso de bactérias e microalgas (Abdel-Raouf et al. 2012).

O processo de tratamento é bastante simples, no qual o efluente que deve ser tratado entra de um lado da lagoa e sai pelo outro, sendo tratado ao longo do curso, considerando o tempo gasto na lagoa (uma média de 20 dias). Para maior eficiência, é possível usar várias lagoas sequenciais. A lagoa pode ser dividida em 3 partes, sendo zonas anaeróbicas, aeróbicas e facultativas (von Sperling 2007b).

No fundo da lagoa, sólidos orgânicos (partículas BOD) fazem a lama (área anaeróbica). Nesta parte, a matéria orgânica é degradada por bactérias anaeróbicas em CO<sub>2</sub>, metano, sulfato de hidrogênio, entre outros. Compostos orgânicos dissolvidos (BOD solúvel) ficam no topo da lagoa e fazem a área aeróbica, onde as microalgas são responsáveis pela oxidação da matéria orgânica. Ambas as fases se complementam, tendo um equilíbrio na produção e consumo de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Durante o dia, microalgas realizam fotossíntese. À noite, as bactérias, que podem se desenvolver tanto na presença quanto na ausência de O<sub>2</sub>, são responsáveis por estabilizar a matéria orgânica. Essas bactérias em condições anóxicas usam nitrato como o receptor final de elétrons, tornando a área facultativa, e assim nomeando a principal lagoa de estabilização. As microalgas são vitais neste método de tratamento, e a concentração pode chegar a até 200 mg/L. Entre as algas mais encontradas estão as algas verdes do gênero *Clamydomonas* e *Chlorella*, e cianobactérias do gênero *Oscillatoria* e *Anabaena* (von Sperling 2007b; Abdel-Raouf et al. 2012).

Algumas vantagens perceptíveis das lagoas facultativas incluem a simplicidade e confiabilidade do processo, dispensando máquinas ou mão de obra, além de baixo capital e custo operacional. Em contrapartida, a desvantagem está associada à influência do meio ambiente no processo, como controle da luz solar, temperatura e oscilação climática, e extensas áreas

ocupadas.

### **2.3 Sistemas de lodo ativados**

O sistema de lodo ativo é o processo de tratamento convencional de efluentes mais utilizado, especialmente para efluentes domésticos. O objetivo do sistema é retirar matéria orgânica e componentes nitrogenados através de reações bioquímicas aeróbicas. O processo de tratamento é mais complexo, o que requer dois tanques e lodo floculante ativado o suficiente para a inoculação (Mohsenpour et al. 2021). Os flocos de lodo ativados são formados a partir da decantação e oxidação do efluente, através da aeração intensa, formando uma matriz gelatinosa que possui bactérias, protozoários, microalgas entre outros microrganismos. Os flocos são adicionados ao primeiro tanque, chamado tanque de aeração. A função do lodo no tanque de aeração é promover a geração de flocos de lodo recém-ativados, e a entrada, oxigênio para induzir a floculação. O efluente que contém o lodo ativo é direcionado para o segundo tanque, chamado tanque de decantação, que envia os flocos para o fundo do tanque, permanecendo o líquido límpido na superfície. O líquido limpo pode ser enviado ao corpo de água receptor, embora se ainda houver contaminantes deve ser submetido a um tratamento suplementar, por exemplo, tratamento anaeróbico para remover fósforo ou tratamento terciário para remover componentes mais específicos. Para o lodo restante, parte dele é reciclado para o tanque de aeração, para funcionar como um novo inóculo para o próximo processo. Todo o ciclo leva em média de 10 a 18 dias (Andreoli et al. 2007).

A principal vantagem do processo é a eficiência de remoção, que se aproxima de 70% em algumas configurações, com um método bem definido e muitas alternativas para complementar e otimizar. Entre as principais desvantagens do processo, está a necessidade de um processo anaeróbico auxiliar, para remover os demais componentes, o gasto energético e aeração do sistema, além da formação de resíduo tóxico (lodo) (von Sperling 2015).

O destino final do lodo é um grande inconveniente e, geralmente, muitos sistemas incineram esse material. No entanto, por razões ambientais, esse procedimento causa a geração de poluentes secundários, como a emissão de gases nocivos. Com isso, foram feitas alternativas para o destino, como o uso do lodo como substrato para cultivar misturas de microalgas e bactérias. O

tratamento de efluentes que contém o lodo é processado em um único estágio, fazendo com que a mistura de microalgas/bactérias minimize a complexidade e a energia necessária para tratar o resíduo. O nitrogênio é facilmente assimilado por microalgas, transformando-se em óxido de nitrogênio, enquanto fósforo e carbonáceos são consumidos no crescimento de microalgas e bactérias. O processo gera menos gases de efeito estufa porque existe um equilíbrio entre os processos aeróbicos e anaeróbicos (Nguyen et al. 2020; Mohsenpour et al. 2021).

#### **2.4 Sistemas de cultivo de microalgas**

Muitos esforços na pesquisa têm sido direcionados para projetos e operação de sistemas de cultivo de microalgas para tratamento de águas residuais para alcançar alta eficiência e custo-benefício. Existem muitos tipos desses sistemas, que diferem entre sistemas abertos e fechados. Todas essas abordagens podem estar associadas ao tratamento de efluentes.

Sistemas abertos são os mais usados comercialmente, que incluem lagoas de pista e tanques circulares. Possuem uma extensa área de superfície, alcançando até 5.000 m<sup>2</sup>, e baixa profundidade, entre 0,2 a 0,4 metros, o que facilita a penetração da luz. São de baixo custo e fáceis de implementar, operar e escalar. Entre as desvantagens, destacam-se a influência do meio ambiente, exposição a contaminantes e alta taxa de evaporação. Todos esses gargalos influenciam a baixa produtividade do sistema e os altos custos de colheita (Acién et al. 2017).

Assim, o projeto do sistema de cultivo de microalgas para tratamento e manejo de resíduos é um fator determinante para aplicações bem-sucedidas em larga escala voltadas para alta remoção de nutrientes e produtividade de biomassa (Li et al. 2019). Sistemas fechados, que normalmente incluem fotobiorreatores tubulares, placas planas e colunas de bolhas, são projetados para atingir esse objetivo. Eles desempenham um papel crucial no desempenho contínuo e estável do processo a longo prazo. Fotobiorreatores tubulares, por exemplo, têm a configuração mais promissora em escala industrial (Assunção e Malcata 2020). São equipamentos construídos por longos tubos transparentes de plástico ou vidro, com diâmetro interno de aproximadamente 0,1 m dispostos em *loops*, e alinhados horizontal ou verticalmente. Sob este arranjo, os

fotobiorreatores tubulares são projetados e otimizados para melhorar a captura de luz, propriedades hidrodinâmicas e produtividade. Além disso, deve ter uma estrutura adequada para que o O<sub>2</sub> não se acumule nos tubos e, portanto, muitos modelos são equipados com um tanque de retenção (zona de degaseificação) que deve dispersar o O<sub>2</sub> dissolvido e homogeneizar o meio. As vantagens perceptíveis incluem alta produção de biomassa, controle do sistema e dimensionamento linear. No entanto, as desvantagens são puramente econômicas, que podem ser contornadas de várias maneiras (Satyanarayana et al. 2011; Abdel-Raouf et al. 2012; Ación et al. 2017; Vo et al. 2018).

A Figura 2 exemplifica um fotobiorreator tubular compacto em escala industrial. O sistema está instalado no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), localizado em Curitiba-PR, Brasil, onde atuam os autores deste trabalho. A usina possui 5 fotobiorreatores (2 m × 5 m × 8 m) com 12 m<sup>3</sup> de capacidade, 3,5 km de tubos transparentes e uma área de 10 m<sup>2</sup> cada, além de fotobiorreatores em escala piloto. Eles estão operando sob a entrada de vários tipos de resíduos, como emissões de CO<sub>2</sub>, efluentes sólidos e líquidos. O foco do grupo de pesquisa é a geração de energia renovável a partir de microalgas (por exemplo, biocombustíveis) bem como a produção paralela de outros produtos de valor comercial (Vargas et al. 2014; Corrêa et al. 2017; Telles et al. 2018; Miyawaki et al. 2021). A concepção de engenharia dos fotobiorreatores foi patenteada sob registro US2012088296A1 e WO2012050608A1.

Figura 2 - Fotobiorreatores tubulares compactos de larga escala para cultivo de microalgas no NPDEAS (Curitiba, Paraná, Brasil).



Fonte: Da Silva et al. (2022)

### 3. Sistemas de imobilização biológica

O tratamento de resíduos por microalgas ainda tem alguns gargalos, como sua recuperação do efluente tratado. Novas tecnologias têm sido consideradas, como a imobilização celular. Esta técnica consiste em prender ou fixar células em uma matriz através de interações físico-químicas. O uso de biomassa imobilizada para o tratamento de efluentes está sendo cada vez mais estudado, como mostra a Tabela 3. A imobilização tende a melhorar as características intrínsecas dos microrganismos, como a remoção da retenção de DBO, sólidos, além de eliminar a etapa de sedimentação. Portanto, o sistema celular imobilizado pode aumentar a eficiência e diminuir os custos do processo biológico (Giese 2015).

Tabela 3 - Tratamento de resíduos por microalgas imobilizadas.

<b>Espécie</b>	<b>Fonte de águas residuais</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
<i>Scenedesmus intermedius</i>	Estrume de porco	Alginato de sódio	(Jiménez-Pérez et al. 2004)
<i>Synechococcus elongatus</i>	Águas residuais artificiais	Quitossana	(Aguilar-May e Sánchez-Saavedra 2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esgoto do matadouro de aves	Alginato de sódio	(Hameed 2007)
<i>Scenedesmus abundans</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente secundário	Alginato de sódio	(Kube et al. 2020)
<i>Desmodesmus</i> sp	Águas residuais domésticas	Alginato de sódio	(Wang et al. 2020)
<i>Lobosphaera</i> sp.	Efluente secundário	Quitossana	(Vasilieva et al. 2021)
<i>Pseudomonas putida</i>	Águas residuais artificiais	Álcool polivinyl	(Al-Zuhair e El-Naas 2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Efluente secundário do lodo ativada	Álcool polivinyl	(Huang e Wang 2003)

Fonte: Da Silva et al. (2022)

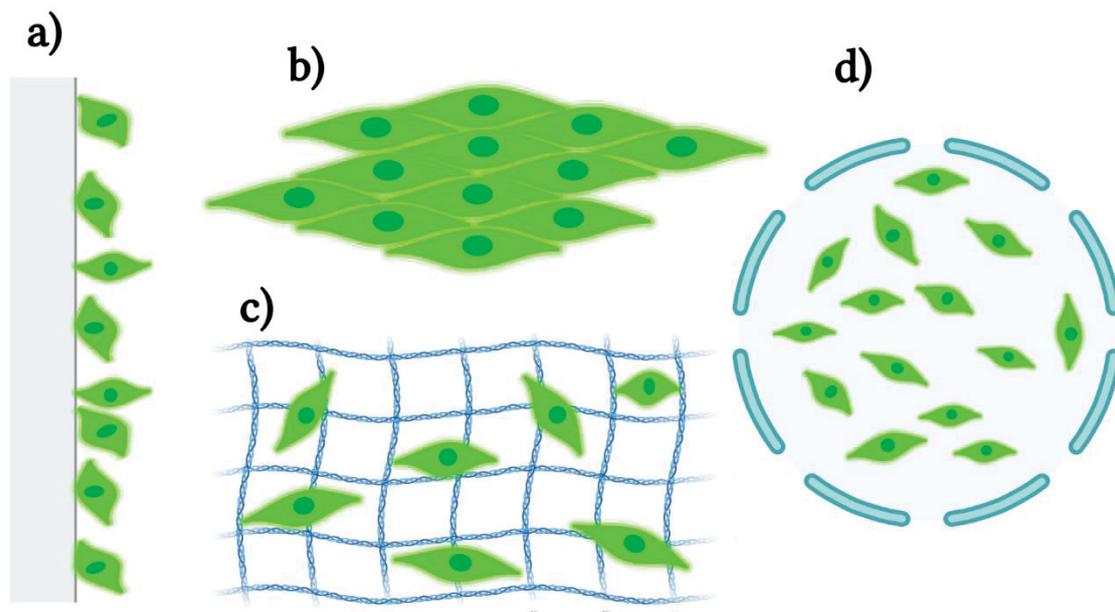
A matriz de imobilização, comumente chamada de suporte, deve ter algumas características básicas para aplicação, sendo as principais: não tóxica para as células, resistente à degradação química e biológica, alta capacidade de retenção celular, apresentando maleabilidade a cargas mecânicas (tensão de cisalhamento, compressão e pressão interna do gás), e permitir a difusão de substratos e produtos.

Existem três categorias principais quanto à origem do material que podem ser utilizados como suporte, que podem ser definidos como (i) materiais poliméricos naturais, utilizando alginato, celulose e colágeno; (ii) materiais poliméricos sintéticos, utilizando poliácridamida, poliestireno e poliuretano; e (iii) materiais inorgânicos, utilizando alumina, zircônia e sílica (Schmidell et al. 2001).

Além disso, as principais técnicas de imobilização celular podem ser classificadas em dois grupos principais, como a imobilização com material de suporte (adsorção, aprisionamento e encapsulamento) e auto-imobilização (autoagressão de células e auto-floculação), conforme exemplificado na Figura

3. Em geral, a imobilização confere algumas vantagens, sendo as principais: a possibilidade de reciclagem ou descarte, resistência à contaminação e maior resistência mecânica, química e térmica. A imobilização de células de microalgas melhora o custo-benefício dos processos de biorremediação (Wittmann e Liao 2016).

Figura 3 - Sistemas de imobilização de células microalgas.



Nota: (a) microalgas ligadas ao suporte por adsorção; (b) Formação de biofilme por auto-imobilização; (c) Microalgas presas dentro da matriz; (d) Microalgas encapsuladas na matriz.  
Fonte: Da Silva et al. (2022)

### 3.1 Adesão ou adsorção

A adesão de microrganismos às superfícies é algo comum na natureza, no entanto, o método de adsorção tende a forçar uma interação entre o microrganismo e a superfície desejada. As ligações entre as células e o suporte são moduladas por processos físico-químicos, como pH e força iônica, principalmente por ligações covalentes que resultam em interações hidrofóbicas ou hidrofílicas. Entre os métodos de imobilização, a adsorção parece ser relativamente a mais barata, dependendo principalmente do custo do suporte. Apesar da vantagem econômica, o processo apresenta algumas desvantagens, como a redução da viabilidade, dano à superfície celular, e perda de biomassa

de acordo com o uso do suporte após a imobilização. A eficiência do processo de imobilização pode ser melhorada pela formação de poros na superfície do suporte, ou pela lavagem do suporte com soluções eletrolíticas ou policatiônicas, o objetivo é promover interações eletrostáticas entre a superfície celular e o suporte (Schmidell et al. 2001; Moreno-Garrido 2008; Giese 2015).

### **3.2 Autoimobilização**

Muitas células podem se auto-flocular ou formar biofilmes naturalmente ou induzidos pelo estresse. Algumas espécies de microalgas, como a *Scenedesmus obliquus*, têm essa capacidade de bioflocular, formar agregados celulares associados à sedimentação rápida, e formar biofilmes, formando uma superfície abstrata através de conexões entre as células. Normalmente, esses mecanismos são ativados devido à (i) excreção de macromoléculas orgânicas, como glicose, manose, galactose e frutose; (ii) crescimento de células filhas adjacentes; (iii) estresses ambientais, como pH, temperatura e escassez de nutrientes (Wittmann e Liao 2016; Mantzourou e Ververidis 2019).

O mecanismo de autoimobilização tem várias vantagens em relação às técnicas tradicionais de imobilização, incluindo o fato de não exigir o uso de suportes, o que torna a técnica a mais promissora e importante na indústria de bioprocessos. Além disso, simplicidade, baixo consumo de energia e custo com material de suporte, recuperação da biomassa sem contaminação pelo suporte, melhor propagação microbiológica devido à ausência da barreira física e melhor adaptação à produção de metabólitos produtos primários como o etanol (Wittmann e Liao 2016).

### **3.3 Aprisionamento dentro da matriz**

A metodologia de aprisionamento é uma das técnicas mais estudadas para imobilização celular e é dividida em duas categorias principais: aprisionamento em matrizes de gel e aprisionamento em partículas porosas. Neste método, as células ficam contidas em um complexo rígido ou semirrígido. Para imobilização de gel, podem ser usados polissacarídeos (alginatos, quitosana e ágar) ou matrizes poliméricas (colágeno e álcool poli vinílico). Normalmente, o crescimento dos microrganismos é parcialmente inibido ou limitado à porosidade

do suporte, a formação de um gradiente de concentração entre produtos e substratos dentro e fora da matriz, o que força o transporte de massa através da difusão. Não obstante, a imobilização em poros matriciais também é uma opção quando é necessário suporte com alta resistência a compressão e abrasão ou exige um processo em larga escala. No entanto, as células agregadas em uma matriz podem apresentar problemas de baixa produtividade devido ao inevitável descolamento celular do suporte e uso excessivo (Mallick 2002; Wittmann e Liao 2016).

### **3.4 Células contidas atrás de uma barreira**

Esta técnica, normalmente denominada encapsulamento, é baseada no aprisionamento das células por uma membrana em forma de cápsula, com características porosas ou propriedades semipermeáveis. A membrana separa as células do meio externo aquoso, permitindo que pequenas moléculas entrem (gás e nutrientes) dentro da cápsula. O crescimento celular é limitado ao tamanho da cápsula, que é feita de alginato ou poli-L-lysina (PLL). Inicialmente, a técnica foi utilizada para o desenvolvimento de medicamentos em empresas farmacêuticas. No entanto, a facilidade de reprodução da técnica permitiu a aplicação em outras áreas, como processos fermentativos (Guisan 2006).

O processo é considerado relativamente barato, dependendo do material utilizado na formação das cápsulas. Além do custo, a técnica apresenta outras vantagens, como conveniência para retirar as cápsulas do cultivo, possibilidade de reaproveitamento das esferas ou cápsulas com o microrganismo. Além disso, são transparentes e não são tóxicas (Moreno-Garrido 2008). Por outro lado, as cápsulas não têm resistência mecânica e podem romper, mas essa deficiência pode ser superada com uma segunda camada polimérica na superfície da cápsula, normalmente um tratamento com quitosana é suficiente (Giese 2015).

## **4. Cultivo de microalgas imobilizadas**

Uma vez que o processo de imobilização celular ocorra, a cultura das microalgas pode ser usada em biorreatores não convencionais. A maioria dos fotobiorreatores de microalgas imobilizadas são compostos por colunas continuamente operadas, como leitos fluidizados e biorreatores de membrana.

Normalmente, o cultivo de microalgas imobilizadas tem o objetivo de produzir biomassa e extrair produtos energéticos e, paralelamente, o tratamento de efluentes (Schmidell et al. 2001; Vasilieva et al. 2016).

No entanto, a taxa de crescimento das microalgas imobilizadas é ligeiramente menor quando comparada com as microalgas cultivadas livremente. Estudos de Zhou et al. (2012) mostraram que a duração da fase de *lag* (fase de adaptação celular em um novo ambiente, com uma taxa de crescimento  $\mu \approx 0$ ) foi maior no cultivo de *S. obliquus* imobilizado em carragena. No entanto, com base no crescimento celular, essa diferença desapareceu e a densidade máxima de cultivo atingiu valores semelhantes.

O cultivo de microrganismos pode ser operado em diferentes configurações, sendo comumente em batelada, batelada alimentada, contínuo e plug-flow (método específico para biorreatores de leito fixo, em regime contínuo). Em cultivos operados em batelada, o substrato é adicionado juntamente com o inóculo dos microrganismos, e nenhum material é inserido no processo, exceto O<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>. Enquanto no regime de batelada alimentada, o substrato é adicionado em intervalos de tempo regulares. Ambos os processos são finalizados após o consumo de todo o substrato e preenchimento do biorreator, para remoção final do produto. Em um biorreator operado no modo contínuo, há entradas e saídas contínuas de mesma proporção, contendo meio de cultivo fresco e meio com produtos formados, respectivamente (Schmidell et al. 2001). Cada modo de operação tem suas vantagens e desvantagens, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Vantagens e desvantagens de diferentes modos de operação da cultura celular.

<b>Operacional método/sistema</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
1. Modo contínuo (Sistema aberto)	a - É a melhor opção para a produção em larga escala de produtos de baixo valor; b - Alta produtividade; c - Qualidade constante do produto; d – Fácil automação e controle;	a - Risco de contaminação b - A linhagem pode sofrer mutação após um longo tempo de produção, resultando em uma cepa ineficiente c – Operações

		unitárias podem ser complicadas no modo contínuo d - Processo não flexível
2. Batelada (Sistema fechado)	a - A adaptação a diferentes processos é fácil e de baixo custo; b - Baixo risco de contaminações (através de esterilizações constantes) e mutação (curto tempo de processo);	a - Alto custo operacional b - Tempo de inatividade considerável para esterilização, início da produção e limpeza c - Processos delicados para enchimento e esvaziamento do reator
3. Batelada alimentada (Sistema aberto)	a - As mesmas vantagens do regime de batelada b - Redução dos efeitos de inibição por subproduto e substrato	a - Custos mais elevados em relação ao regime de batelada simples b Grande volume a ser processado
<i>Plug Flow</i>		
1. Modo contínuo (Sistema aberto)	a - Alta conversão de substrato b - Operação de leito fixo (para células imobilizadas ou enzimas) ou filme c - Alta conversão de substratos na fase de gás	a - Requer células imobilizadas b - A diferença entre os tempos de retenção das fases líquida e gasosa requer múltiplas passagens no reator.

Adaptado de: Villadsen et al. (2011).

#### 4.1 Fotobiorreatores de leito fluidizado

Um dos fotobiorreatores mais estudados em todo o mundo e aplicados a microalgas imobilizadas é o fotobiorreator de leito fluidizado, ideal para células imobilizadas por técnicas de aprisionamento ou encapsulamento. O fotobiorreator pode ter várias variações, mas geralmente, consiste em uma coluna vertical de seção circular, onde microalgas imobilizadas são contidas. O meio de cultura ou efluente é então bombeado para o biorreator e o produto tratado ou efluente é removido do lado oposto. Em algumas configurações, é

possível realizar a recirculação do meio para obter melhores resultados (Schmidell et al. 2001; Moreno-Garrido 2008).

Geralmente, os biorreatores de leito fluidizados são projetados em pequenas escalas, mas é usado principalmente na produção de etanol por leveduras. Este modelo de biorreator tem homogeneidade quase completa, o que o torna um sistema confiável e replicável (Schmidell et al. 2001). De acordo com Cheirsilp et al. (2017), com cultivo em batelada para o tratamento de efluentes e produção lipídica, utilizando *Nannochloropsis* sp., foi possível remover mais de 90% dos resíduos nitrogenados e fosfatos.

#### **4.2 Fotobiorreatores de biofilme**

O fotobiorreator de biofilme consiste em uma película de microalgas imobilizada, na qual o efluente deve passar por capilaridade, através do filme ou da seção, como uma membrana. As microalgas são imobilizadas por técnicas de adsorção em materiais como membranas, filtros, algodão ou espumas. Normalmente usados em escala laboratorial, este biorreator não é homogêneo e produz um gradiente de concentração junto com o filme. Este modo de operação contínuo, comum em biorreatores de leito fixo, é chamado de Plug-flow (Villadsen et al. 2011; Assunção e Malcata 2020).

As microalgas que compõem o biofilme têm alta eficiência no tratamento de efluentes. No entanto, eles precisam de mais área superficial no biofilme para realizar a fotossíntese, com melhor uso da luz, quando comparados com algas livres. A facilidade da colheita de biomassa e a alta produtividade são as melhores vantagens deste fotobiorreator (Mantzorou e Ververidis 2019).

### **5. Bioenergia a partir de microalgas**

O resíduo é fonte de um grande número de nutrientes, ricos principalmente em nitrogênio, fósforo e matéria orgânica. O uso de processos à base de microalgas permitiu a remoção de cerca de 70% dos nutrientes desses efluentes, que são convertidos em diversos produtos, especialmente energéticos (Severo et al. 2019). Muitas microalgas utilizadas para a fitorremediação, como *Chlorella* sp., *Botryococcus braunii*, e *Scenedesmus* sp., possuem alta concentração de

lipídios e carboidratos, entre os quais os principais combustíveis que podem ser produzidos são biodiesel, bioetanol, biohidrogênio, biogás e biobutanol (Deprá et al. 2018; Kumar et al. 2021; Severo et al. 2021). Alguns exemplos de pesquisa podem estar na Tabela 5.

Além disso, existem algumas fontes emergentes de produtos energéticos de microalgas que estão sob investigação, como a bioeletricidade de células de combustível microbiana à base de microalgas, combustão direta de biomassa para gerar calor e a biogeração de compostos orgânicos voláteis com potencial energético para uso como biocombustíveis gasosos em sistemas térmicos (Deprá et al. 2018; Severo et al. 2018; Severo et al. 2020).

Tabela 5 - Biocombustíveis produzidos por biomassa e processo de microalga.

<b>Biocombustível</b>	<b>Processo</b>	<b>Microalgas</b>	<b>Referências</b>
Biodiesel	Transesterificação química por catalise ácida/alcalina	<i>Clamídonas mexicanas</i>	Abou-Shanab et al. (2013)
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	Han et al. (2016)
		<i>Nannochloropsis sp.</i>	Jiang et al. (2011)
Bioetanol	Fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	Abdulla et al. (2020) Ho et al. (2013a)
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ho et al. (2013b)
Biohidrogênio	Fotólise, fermentação	<i>Clamídonas reinhardtii</i>	Hwang et al. (2014)
Biogás	Digestão anaeróbica da biomassa	<i>Cenadesmus sp.</i>	Kumar et al. (2016)
		<i>Clamídoonas subcaudata</i>	Hernández et al. (2016)
Biobutanol	Fermentação por <i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Chlorella kessleri</i>	Caporgno et al. (2015)
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Gao et al. (2016)
		<i>Cenadesmus sp.</i>	Castro et al. (2015)

Fonte: Da Silva et al. (2022)

## 5.1 Biodiesel

O biodiesel é o biocombustível que ganhou maior visibilidade como alternativa ao uso do diesel fóssil. Pode ser produzido a partir de várias matérias-primas, como microrganismos (levedura e algas), gordura animal e óleos

vegetais. No entanto, o uso de microalgas como fonte de biodiesel oferece algumas vantagens, como produtividade relativamente alta, biossíntese lipídica eficiente e não competir com culturas de óleo terrestre. Além disso, o biodiesel é caracterizado por produzir baixos níveis de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, e hidrocarbonetos não queimados do que o diesel à base de petróleo, e é biodegradável, renovável e não tóxico. Outro fator crítico é a quantidade e a composição lipídica, pois determinam a estabilidade oxidativa do biodiesel juntamente com as propriedades de desempenho nos motores a combustão (Koberg et al. 2011; Gupta e Bux 2019).

Além disso, a biomassa microalgas tem considerável teor lipídico, variando de 10 a 50% de seu peso seco. Lipídios, também conhecidos como ácidos graxos, são convertidos em biodiesel (monoalquil-ésteres de ácidos graxos) via transesterificação (Kumar et al. 2021). Por exemplo, *Botryococcus braunii* tem a capacidade de sintetizar e armazenar alto teor de hidrocarbonetos, que podem superar 70% de sua biomassa seca. Mas o gargalo relacionado a essa microalga é sua baixa taxa de crescimento, resultando em baixa biomassa e produtividade lipídica. Os valores encontrados na literatura estão entre 0,1 e 0,3 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> quando comparados com outras cepas de microalgas. Segundo Francisco et al. (2010), o teor lipídico de diferentes espécies de microalgas variou de 6,3 a 27%, em que a *Chlorella vulgaris* foi a microalga com melhor desempenho em termos de produtividade lipídica, taxa de crescimento celular e perfil de ácidos graxos com qualidade para produção de biodiesel. Essas comparações representam que o conteúdo lipídico e a produtividade não estão diretamente relacionados.

Se uma microalga produzisse uma alta quantidade de biomassa e teor médio de óleo de 30% em peso seco, isso representaria quase 100 m<sup>3</sup> por hectare de biodiesel gerado (Deprá et al. 2018). Essa relação, no entanto, não é viável. Isso porque os custos de produção de biodiesel de microalgas são excessivamente altos (variando de USD 0,42 a 22,60 por litro). Para atender às demandas energéticas atuais, teria que ser fabricado em grandes volumes e essa limitação depende quase inteiramente do rendimento do óleo microalgal e do sistema de cultivo para operar em larga escala (Severo et al. 2019).

## 5.2 Bioetanol

Microalgas podem ser usadas como fonte de carboidratos (amido, glicose e celulose), porém, em geral, sua concentração total não atinge 50% do peso da biomassa. No entanto, não possui lignina em seu componente celular, eliminando o pré-tratamento para facilitar o acesso aos carboidratos (Jambo et al. 2016).

A biomassa microalgal sofre processos físicos, químicos e biológicos para transformar carboidratos em açúcares fermentescíveis. Depois disso, os açúcares fermentescíveis servem como substrato à fermentação alcoólica, geralmente promovida por leveduras, como *saccharomyces cerevisiae*. A produtividade do bioetanol depende da concentração de carboidratos presente nas microalgas e da taxa de conversão de álcool do microrganismo fermentador. Como não possuem alto teor de carboidratos em sua composição, sua biomassa não é competitiva o suficiente para comercialização. Portanto, uma alternativa a esse inconveniente seria a modificação genética da cepa para aumentar a produtividade (Jambo et al. 2016; Kumar et al. 2021).

## 5.3 Biometano e biohidrogênio

O biometano pode ser produzido a partir da digestão anaeróbica da biomassa microalgas. Geralmente, esse procedimento ocorre em duas etapas. Em primeiro lugar, qualquer carboidrato ou açúcar fermentescível é convertido em álcool através do processo de fermentação, promovido por bactérias anaeróbicas. Na segunda parte do processo, as bactérias metanogênicas utilizam o produto da etapa anterior para produzir biometano. Uma das principais fontes de biomassa para a produção de biometano é a microalgas de lodo, que vem de processos de tratamento de efluentes. Utilizando o conhecimento das biorrefinarias, é possível utilizar a biomassa residual das microalgas, após extrair lipídios para a produção de biodiesel, obtendo o máximo de energia (Gupta e Bux 2019). Mais de 60% do biometano pode ser produzido a partir da biomassa microalgal devido às baixas exigências energéticas durante seu processamento (Deprá et al. 2018).

Outro biocombustível gasoso produzido a partir de microalgas é o biohidrogênio. Ao contrário de outros biocombustíveis, não é necessária interrupção no processo de biomassa. As microalgas sob certas condições de

estresse podem produzir o gás sem o uso de processos fermentativos. Hwang et al. (2014) observaram que a cultura fotoheterotrófica usando *clamídias reinhardtii*, contendo acetato ou butirato, ambas substâncias ricas em águas residuais, era capaz de produzir grandes concentrações de biohidrogênio durante o crescimento celular. A microalga *Chlorella sp.* e *S. obliquus* também são capazes de produzir o composto pelo mesmo mecanismo. O processo de produção ocorre por biofotólise direta, na qual as microalgas usam a luz solar como fonte de energia para quebrar moléculas de água em prótons (H<sup>+</sup>), elétrons e oxigênio (Gupta e Bux 2019; Kumar et al. 2021).

#### **5.4 Biobutanol**

Biobutanol é um álcool de quatro carbonos produzido pela fermentação da biomassa. Como fonte de produção, podem ser utilizados carboidratos à base de microalgas e glicerol residual da produção de biodiesel. É comumente obtido a partir da fermentação da biomassa de *Chlorella vulgaris* pela bactéria *Clostridium acetobutylicum*. Entre as principais vantagens do biobutanol, pode se destacar por sua alta densidade e baixa volatilidade, quando comparado ao bioetanol. Além disso, o biobutanol possui diversas aplicações na indústria, como solventes químicos. A produção de biobutanol a partir de microalgas é considerada comercialmente viável, e seu potencial como candidato a biocombustível pode atrair a atenção de pesquisadores nos próximos anos (Gupta e Bux 2019; Kumar et al. 2021).

### **6. Conclusões e recomendações**

Embora a fitorremediação tenha um enorme potencial para resolver problemas ambientais, até agora, poucas tecnologias foram levantadas a partir de anos de pesquisa para usar microalgas na gestão de resíduos. Muitas investigações têm sido conduzidas para alcançar o melhor potencial de aplicação industrial, como a imobilização de microalgas, e sua combinação com outros processos.

Há dois gargalos visíveis para o tratamento de resíduos com microalgas. Em primeiro lugar, é um critério puramente econômico, ou seja, utilizando um método convencional baseado em produtos químicos, que é mais barato e simples, praticamente impede a aplicação do método biológico que, por sua vez,

é mais caro. Neste caso, levando em conta o volume de efluentes a serem tratados, um ligeiro aumento nos custos operacionais, pode inviabilizar uma tecnologia ecológica para as estações de tratamento de efluentes. Em segundo lugar, o critério a ser considerado é em termos da eficiência de remoção dos compostos poluentes e sua quantidade. Isso representa uma lacuna de dias quando se usa microalgas, que muitas vezes depende de parâmetros ambientais oscilatórios, em comparação com as horas que um método convencional e estável leva.

Hoje, uma das melhores opções é a adoção da abordagem de integração de processos no contexto de biorrefinaria, no qual a imobilização de microalgas pode ser uma tecnologia complementar às rotas químicas convencionais, além da potencial geração de insumos energéticos, o que poderia ser um ponto de retorno financeiro. Vale ressaltar que há pressão sobre as empresas poluidoras, não apenas em termos legais, mas também em apresentar em seu portfólio o uso de técnicas ambientalmente corretas, o que beneficiaria sua imagem e aceitação pública.

A expectativa é que a estratégia de imobilização de microalgas possa ser competitiva no mercado quando forem viabilizados os seguintes aspectos: o tratamento concomitante de resíduos, a melhoria dos fotobiorreatores e parâmetros operacionais para aplicações específicas de células imobilizadas, a atualização dos materiais de suporte polimérico e as modificações metabólicas e genéticas das cepas para melhor adesão à matriz e obtenção de metabólitos para conversão em produtos energéticos. Essas são as principais recomendações de ação, que no futuro tornarão a tecnologia de microalgas imobilizadas útil para a biorremediação industrial.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF N, AL-HOMAIDAN AA, IBRAHEEM IBM (2012). **Microalgae and wastewater treatment**. Saudi Journal of Biological Sciences 19:257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>

ABDULLA R, KING TK, JAMBO SA, FAIK AA (2020) **Microalgae *Chlorella* as a sustainable feedstock for bioethanol production**. Green Engineering for Campus Sustainability. Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7260-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7260-5_7)

ABOU-SHANAB RAI, JI MK, KIM HC, ET AL (2013) **Microalgal species**

**growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production.** Journal of Environmental Management 115:257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>

ACIÉN FG, MOLINA E, REIS A, ET AL (2017) **Photobioreactors for the production of microalgae.** Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. In Woodhead Publishing Series in Energy. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>

AGUILAR-MAY B, SÁNCHEZ-SAAVEDRA MDP (2009) **Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.** Journal of Applied Phycology 21:353–360. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9376-7>

AL-ZUHAIR S, EL-NASS M (2011) **Immobilization of *Pseudomonas putida* in PVA gel particles for the biodegradation of phenol at high concentrations.** Biochemical Engineering Journal 56:46–50. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.005>

ANDREOLI CV, VON SPERLING M, FERNANDES F (2007) **Sludge treatment and disposal.** IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402130>

ANJANEYULU Y, SREEDHARA CHARY N, SAMUEL SUMAN RAJ D (2005) **Decolourization of industrial effluents - Available methods and emerging technologies - A review.** Reviews in Environmental Science and Biotechnology 4:245–273. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-1246-z>

ARBIB Z, RUIZ J, ÁLVAREZ-DÍAZ P, et al (2013) **Photobiotreatment: Influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus Obliquus*.** International Journal of Phytoremediation 15:774–788. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.735291>

ASSUNÇÃO J, MALCATA FX (2020) **Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review.** Algal Research 52. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102107>

BARTEN RJP, WIJFFELS RH, BARBOSA MJ (2020) **Bioprospecting and characterization of temperature tolerant microalgae from Bonaire.** Algal Research 50. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102008>

BOROWITZKA MA, BEARDALL J, RAVEN JA (2016) **The Physiology of Microalgae.** Developments in Applied Phycology. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>

CAPORGNO MP, TALEB A, OLKIEWICZ M, et al (2015) **Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane.** Algal Research 10:232–239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>

CASTRO YA, ELLIS JT, MILLER CD, SIMS RC (2015) **Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation.** Applied Energy 140:14–19.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.045>

CHE CA, KIM SH, HONG HJ, et al (2019) **Optimization of light intensity and photoperiod for *Isochrysis galbana* culture to improve the biomass and lipid production using 14-L photobioreactors with mixed light emitting diodes (LEDs) wavelength under two-phase culture system.** *Bioresource Technology* 285:121323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121323>

CHEIRSILP B, THAWECHAI T, PRASERTSAN P (2017) **Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor.** *Bioresource Technology* 241:787–794. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.016>

CHOUDHARY P, PRAJAPATI SK, KUMAR P, et al (2017) **Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications.** *Bioresource Technology* 224:276–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.078>

CORRÊA DO, SANTOS B, DIAS FG, et al (2017) **Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel engine hazardous emissions fixation.** *International Journal of Hydrogen Energy* 42:21463–21475. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.176>

DANESHVAR E, SIK OK Y, TAVAKOLI S, et al (2021) **Insights into upstream processing of microalgae: A review.** *Bioresource Technology* 329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>

DA SILVA, P. A. S.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; SEVERO, I. A. **Phycoremediation: Role of Microalgae in Waste Management and Energy Production.** *Waste-to-Energy*. p.511–537, 2022. Cham: Springer International Publishing. Disponível em: <[https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-91570-4\\_17](https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-91570-4_17)>.

DELL' ANNO F, RASTELLI E, SANSONE C, BRUNET C, IANORA A, DELL' ANNO A (2021) **Bacteria, Fungi and Microalgae for the Bioremediation of Marine Sediments Contaminated by Petroleum Hydrocarbons in the Omics Era.** *Microorganisms* 9, 1695. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>

DEPRÁ MC, DOS SANTOS AM, SEVERO IA, et al (2018) **Microalgal biorefineries for bioenergy production: can we move from concept to industrial reality?** *Bioenergy Research* 11:727–747. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9934-z>

DORAN PM (2013) **Bioprocess engineering principles**, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>

EMPARAN Q, HARUN R, DANQUAH MK (2019) **Role of phycoremediation**

**for nutrient removal from wastewaters: A review.** Applied Ecology and Environmental Research 17:889–915.  
[https://doi.org/10.15666/aeer/1701\\_889915](https://doi.org/10.15666/aeer/1701_889915)

FILIPPINO KC, MULHOLLAND MR, BOTT CB (2015) **Phycoremediation strategies for rapid tertiary nutrient removal in a waste stream.** Algal Research 11:125–133. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.011>

FRANCISCO ÉC, NEVES DB, JACOB-LOPES E, FRANCO TT (2010) **Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology 85:395–403. <https://doi.org/10.1002/jctb.2338>

GALÈS A, TRIPLET S, GEOFFROY T, et al (2020) **Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO<sub>2</sub> fixation improvement in intensive cultures.** Journal of CO<sub>2</sub> Utilization 38:187–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.01.019>

GAO F, YANG ZH, LI C, et al (2014) **Concentrated microalgae cultivation in treated sewage by membrane photobioreactor operated in batch flow mode.** Bioresource Technology 167:441–446.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.042>

GAO K, ORR V, REHMANN L (2016) **Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction.** Bioresource Technology 206:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.036>

GEORGE B, PANCHA I, DESAI C, et al (2014) **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 171:367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>

GIESE EC (2015) **Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio.** CETEM/MCTI.

GROBBELAAR JU (2007) **Algal nutrition - mineral nutrition.** Handbook of Microalgal Culture 95–115. Blackwell Publishing Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch6>

GUISAN JM (2006) **Immobilization of Enzymes and Cells**, 2nd ed. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7>

GUPTA SK, BUX F (2019) **Application of microalgae in wastewater treatment**, 1st edn. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13913-1>

HAMEED MSA (2007) **Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal.** African Journal of Biotechnology 6:1185–1191

HAN SF, JIN W, TU R, et al (2016) **Optimization of aeration for biodiesel**

**production by *Scenedesmus obliquus* grown in municipal wastewater.** Bioprocess and Biosystems Engineering 39:1073–1079.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-016-1585-x>

HENA S, ZNAD H, HEONG KT, JUDD S (2018) **Dairy farm wastewater treatment and lipid accumulation by *Arthrospira platensis*.** Water Research 128:267–277. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.057>

HERNÁNDEZ D, RIAÑO B, COCA M, et al (2016) **Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications.** Chemical Engineering Journal 285:449–458.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.072>

HO SH, HUANG SW, CHEN CY, et al (2013a) **Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E.** Bioresource Technology 135:157–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>

HO SH, HUANG SW, CHEN CY, et al (2013b) **Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.** Bioresource Technology 135:191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>

HUANG G, WANG Y (2003) **Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge at different pH value.** Water Quality Research Journal of Canada 38:541–551.  
<https://doi.org/10.2166/wqrj.2003.035>

HWANG JH, KABRA AN, KIM JR, JEON BH (2014) **Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent.** Energy 78:887–894.  
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.10.086>

JAMBO SA, ABDULLA R, MOHD AZHAR SH, et al (2016) **A review on third generation bioethanol feedstock.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 65:756–769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>

JIANG L, LUO S, FAN X, et al (2011) **Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>.** Applied Energy 88:3336–3341.  
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.043>

JIMÉNEZ-PÉREZ M V., SÁNCHEZ-CASTILLO P, ROMERA O, et al (2004) **Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure.** Enzyme and Microbial Technology 34:392–398. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.07.010>

KOBERG M, COHEN M, BEN-AMOTZ A, GEDANKEN A (2011) **Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation.** Bioresource Technology 102:4265–4269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.004>

KUBE M, MOHSENI A, FAN L, RODDICK F (2020) **Energy and nutrient**

**recovery by treating wastewater with fluidised-beds of immobilised algae.** Journal of Water Process Engineering 38:101585.  
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101585>

KUMAR G, SIVAGURUNATHAN P, THI NBD, et al (2016) **Evaluation of different pretreatments on organic matter solubilization and hydrogen fermentation of mixed microalgae consortia.** International Journal of Hydrogen Energy 41:21628–21640.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.195>

KUMAR R, MEHARIYA S, VERMA P, et al (2021) **Microalgae-based biorefineries for sustainable resource recovery from wastewater.** Journal of Water Process Engineering 40:101747.  
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101747>

LI K, LIU Q, FANG F, et al (2019) **Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review.** Bioresource Technology 291:121934.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121934>

LIMA U DE A, AQUARONE E, BORZANI W, SCHMIDELL W (2007) **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**, 2nd edn. São Paulo: E. Blücher

LU W, ASRAFUL ALAM M, LIU S, et al (2020) **Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: A review.** Science of the Total Environment 716:135247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247>

LUTZU GA, CIURLI A, CHIELLINI C, et al (2021) **Latest developments in wastewater treatment and biopolymer production by microalgae.** Journal of Environmental Chemical Engineering 9:104926.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104926>

MALLICK N (2002) **Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review.** BioMetals 15:377–390.  
<https://doi.org/10.1023/A:1020238520948>

MANTZOROU A, VERVERIDIS F (2019) **Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques.** Science of the Total Environment 651:3187–3201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355>

MICHELS MHA, VASKOSKA M, VERMUË MH, WIJFFELS RH (2014) **Growth of *Tetraselmis suecica* in a tubular photobioreactor on wastewater from a fish farm.** Water Research 65:290–296.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.017>

MIN KJ, OH DY, PARK KY (2021) **Pilot-scale cultivation of water-net in secondary effluent using an open pond raceway for nutrient removal and bioethanol production.** Chemosphere 277:130129.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130129>

MIYAWAKI B, MARIANO AB, VARGAS JVC, et al (2021) **Microalgae derived**

**biomass and bioenergy production enhancement through biogas purification and wastewater treatment.** *Renewable Energy* 163:1153–1165. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.045>

MOHEIMANI NR, VADIVELLOO A, AYRE JM, PLUSKE JR (2018) **Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent.** *Algal Research* 35:362–369. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.007>

MOHSENPOUR SF, HENNIGE S, WILLOUGHBY N, et al (2021) **Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review.** *Science of the Total Environment* 752:142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>

MORENO-GARRIDO I (2008) **MICROALGAE IMMOBILIZATION: Current techniques and uses.** *Bioresource Technology* 99:3949–3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>

NGUYEN TTD, NGUYEN TT, AN BINH Q, et al (2020) **Co-culture of microalgae-activated sludge for wastewater treatment and biomass production: Exploring their role under different inoculation ratios.** *Bioresource Technology* 314:123754. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123754>

NWOBA EG, PARLEVLIT DA, LAIRD DW, et al (2019) **Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency.** *Algal Research* 39:101433. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101433>

PRAJAPATI SK, KAUSHIK P, MALIK A, VIJAY VK (2013) **Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges.** *Biotechnology Advances* 31:1408–1425. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.005>

RICHMOND A (2004) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology.** Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. <http://doi.org/10.1002/9780470995280>

ROSSI S, CASAGLI F, MANTOVANI M, et al (2020) **Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater.** *Bioresource Technology* 305:122995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122995>

SAJJADI B, CHEN WY, RAMAN AAA, IBRAHIM S (2018) **Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97:200–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>

SAMER M (2015) **Biological and Chemical Wastewater Treatment Processes, Wastewater Treatment Engineering.** IntechOpen, DOI: 10.5772/61250

SARKAR P, DEY A (2021) **Phycoremediation – An emerging technique for dye abatement: An overview**. *Process Safety and Environmental Protection* 147:214–225. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.09.031>

SATYANARAYANA KG, MARIANO AB, VARGAS JVC (2011) **A review on microalgae , a versatile source for sustainable energy and materials**. *International Journal of Energy Research* 21. <https://doi.org/10.1002/er>

SCHMIDELL W, LIMA U DE A, AQUARONE E, BORZANI W (2001) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, 2nd edn. São Paulo: E. Blücher

SEVERO IA, DEPRÁ MC, BARIN JS, et al (2018) **Bio-combustion of petroleum coke: The process integration with photobioreactors**. *Chemical Engineering Science* 177:422–430. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.12.001>

SEVERO IA, DEPRÁ MC, DIAS RR, et al (2020) **Bio-combustion of petroleum coke: The process integration with photobioreactors**. Part II – Sustainability metrics and bioeconomy. *Chemical Engineering Science* 213:115412. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115412>

SEVERO IA, DIAS RR, SARTORI RB, MARONEZE MM, ZEPKA LQ, JACOB-LOPES E (2021) Chapter 4: **Technological Bottlenecks in Establishing Microalgal Biorefineries**. In: Shekh A, Schenk P, Sarada R (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Recent Advances, Market Potential, and Sustainability*, Royal Society of Chemistry, p. 118 - 134.

SHI J, PODOLA B, MELKONIAN M (2014) **Application of a prototype-scale twin-layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae**. *Bioresource Technology* 154:260–266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.100>

SIVAKAMINATHAN S, HANKAMER B, WOLF J, YARNOLD J (2018) **High-throughput optimisation of light-driven microalgae biotechnologies**. *Scientific Reports* 8:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29954-x>

STRAKA L, RITTMANN BE (2018) **Light-dependent kinetic model for microalgae experiencing photoacclimation, photodamage, and photodamage repair**. *Algal Research* 31:232–238. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.022>

TELLES EC, YANG S, VARGAS JVC, et al (2018) **A genset and mini-photobioreactor association for CO<sub>2</sub> capturing, enhanced microalgae growth and multigeneration**. *Renewable Energy* 125:985–994. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.027>

VARGAS JVC, MARIANO AB, CORRÊA DO, ORDONEZ JC (2014) **The microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors**. *International Journal of Hydrogen Energy* 39:9588–9598. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.093>

- VASILIEVA S, LOBAKOVA E, GRIGORIEV T, et al (2021) **Bio-inspired materials for nutrient biocapture from wastewater: Microalgal cells immobilized on chitosan-based carriers**. Journal of Water Process Engineering 40:101774. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101774>
- VASILIEVA SG, LOBAKOVA ES, LUKYANOV AA, SOLOVCHENKO AE (2016) **Immobilized microalgae in biotechnology**. Moscow University Biological Sciences Bulletin 71:170–176. <https://doi.org/10.3103/S0096392516030135>
- VILLADSEN J, NIELSEN J, LIDÉN G (2011) **Bioreaction Engineering Principles**, Third Edit. Springer US. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>
- VO HNP, NGO HH, GUO W, et al (2018) **A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment**. Science of the Total Environment 651:1549–1568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.282>
- VON SPERLING M (2015) **Activated sludge and aerobic biofilm reactors**. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402123>
- VON SPERLING M (2007a) **Wastewater characteristics, treatment and disposal**. IWA Publishing UFMG
- VON SPERLING M (2007b) **Waste stabilisation ponds**. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402109>
- WANG R, LI F, RUAN W, et al (2020) **Removal and degradation pathway analysis of 17 $\beta$ -estradiol from raw domestic wastewater using immobilised functional microalgae under repeated loading**. Biochemical Engineering Journal 161:107700. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107700>
- WANG Y, HO SH, CHENG CL, et al (2016) **Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment**. Bioresource Technology 222:485–497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106>
- WITTMANN C, LIAO JC (2016) **Industrial Biotechnology: Products and Processes**. Wiley-VCH & Co.
- YUAN S, HU J, LIU Z, et al (2020) **Modeling microalgae growth in continuous culture: Parameters analysis and temperature dependence**. Energy 195:116961. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.116961>
- ZHAO B, ZHANG Y, XIONG K, et al (2011) **Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO<sub>2</sub> fixation**. Chemical Engineering Research and Design 89:1758–1762. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.02.018>
- ZHOU M, HE H, JIN T, WANG H (2012) **Power generation enhancement in novel microbial carbon capture cells with immobilized *Chlorella vulgaris***. Journal of Power Sources 214:216–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.04.043>

## 1.2 ARTIGO 2 – IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGA PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES

### Resumo

O aumento da contaminação da água e a formação de águas residuais vem aumentando com o tempo, devido ao crescimento progressivo da população e a deficiência na captação da coleta de esgoto. O tratamento convencional de efluentes realizado pelas estações de tratamento de águas, apresentam grandes índices de ineficiência, não chegando ao tratamento mínimo exigido pelo CONAMA, logo, novas tecnologias de tratamento de efluentes devem ser implantadas. O objetivo deste trabalho, consiste em estudar o processo de imobilização da *Tetrademus obliquus* por encapsulamento em matriz de alginato e quitosana, e avaliar o seu potencial como agente biorremediador. O sistema de imobilização celular, é uma excelente alternativa aos meios tradicionais de tratamento, visto que tem como objetivo o aumento da eficiência e a diminuição dos custos nos processos, eliminando as etapas de decantação para remoção das microalgas no tratamento secundário. Além de que, é possível realizar o tratamento das águas residuárias, junto ao processo de produção de biomassa de microalga, reduzindo a concentração de contaminantes em cerca de 80% e atingindo rendimentos de até 1,6 g/L de biomassa. Este processo é relativamente novo e ainda possui campos a serem explorados e possibilidades de implementações tecnológicas.

**Palavras chaves:** Águas residuais; Tratamento de efluentes; Imobilização celular.

### 1. Introdução

As águas residuais são os recursos hídricos que possuem suas características alteradas, contaminadas por esgotos domésticos ou industriais, assim como um vetor, carregam microrganismos patogênicos ou substâncias tóxicas capazes de causar doenças infecciosas ou intoxicações (SILVA, 2011). Essas, constituídas principalmente por carbonáceos orgânicos (determinados pela demanda bioquímica de oxigênio – BOD) e compostos inorgânicos, como fosfatos, amônio, bicarbonato, sódio, entre outros Abdel-Raouf et al. (2012 e Mohsenpour et al. (2021). Quando a matéria orgânica e compostos ricos em nitrogênio e fosforo são os principais poluentes, preferencialmente, deve-se utilizar por processos biológicos para o tratamento, pois são mais simples, eficientes e com um custo mais barato quando comparado aos demais processos.

Segundo dados da UNESCO, 2017, a quantidade de águas residuais está aumentando conforme os anos e isso é devido a dois fatores principais, sendo em primeiro lugar, o aumento do crescimento populacional, o qual em menos de 20 anos saltou de 314 milhões de pessoas para quase 500 milhões de pessoas. O segundo motivo é devido à baixa cobertura e captação da coleta de esgoto, sabendo que muitas vezes a expansão dos serviços de abastecimento e saneamento não são realizados simultaneamente, então a população tende a depender de efluentes locais como sistema de eliminação, que é removida pelo escoamento ou infiltração em recursos hídricos próximos ou subterrâneos, que por sua vez acabam sendo contaminados.

Dados da Agência Nacional de Águas (ANA) em 2017, revelou que apenas cerca de 43% do esgoto nacional é coletado e tratado, e apenas 39% da carga orgânica é removida pelas 2.768 estações de tratamentos, ficando abaixo do estabelecido pelo CONAMA.

As microalgas são microrganismos clorofilados, eucarióticos ou procarióticos, responsáveis por aproximadamente metade de todo dióxido de carbono fixado no mundo. Na presença da luz solar, esses microrganismos são capazes de converter o dióxido de carbono (carbono inorgânico presente na atmosfera) e água, em oxigênio e biomassa, através do processo de fotossíntese. Borowitzka et al. (2016) e Sajjadi et al. (2018).

As microalgas, possuem um papel de grande importância para a ecologia, e cada vez mais na biotecnologia, podendo ser facilmente encontradas no meio ambiente. Com uma rápida taxa de crescimento, elas são capazes de serem cultivadas em águas não potáveis, sem a necessidade de um meio rico em nutrientes energéticos, dependendo de uma área relativamente pequena para seu crescimento Gouveia; Oliveira (2009).

Essas vantagens permitem uma grande aplicabilidade industrial desses microrganismos, atraindo o interesse de pesquisadores e indústrias, nas áreas da farmácia, engenharia química, biologia, meio ambiente, energia, dentre outras Daneshvar et al. (2021).

O processo de biorremediação tem o objetivo de remover ou tratar os contaminantes, consumindo-os como nutrientes para produção de biomassa, e de degradar ou transformar os compostos químicos tóxicos em compostos

inertes. Este processo ocorre principalmente de três formas, consistindo em: biossorção, biocoagulação e biodegradação.

Como o tratamento de águas residuais é um imprescindível, a busca por novas tecnologias de tratamento é urgente, e sistema de células imobilizadas pode ser considerada uma possível solução. A imobilização celular é um processo, que consiste em aprisionar ou fixar células em uma matriz através de interações físico-químicas. A imobilização celular tem como benefício o aumento da produtividade e a diminuição do custo do bioprocessos. Em relação ao tratamento de efluentes, a imobilização vem sendo utilizada para melhorar a retenção de sólidos, eliminar etapas de sedimentação e aumentar a eficiência de tratamento de efluentes muito diluídos (GIESE, 2016).

## **2. Justificativa e objetivos**

### **2.1 Justificativa**

Junto com o aumento populacional e a baixa captação e coleta de esgoto, tem-se o aumento de contaminações em recursos hídricos. As estações de tratamento não são capazes de remover o mínimo exigido de carga orgânica, assim entregando uma água de má qualidade. A água contaminada é capaz de causar doenças e intoxicações, fazendo assim necessário a busca por novas tecnologias de tratamento de efluentes.

### **2.2 Objetivo Geral**

Estudar o processo de imobilização da alga *Tetradismus obliquus* em matriz de alginato de sódio e quitosana, para posterior avaliação do potencial no tratamento de efluentes e desenvolvimento de tecnologia.

### **2.3 Objetivos específicos**

- Produzir microesferas de alginato e quitosana, contendo algas imobilizadas pela técnica de encapsulamento;
- Caracterizar a microesfera por microscopia;

- Estabelecer o tempo e parâmetros de cultivo e crescimento das microalgas imobilizadas;
- Avaliar o potencial de biorremediação das microalgas imobilizadas;
- Avaliar a durabilidade das microesferas em que as microalgas ainda continuam viáveis;
- Desenvolvimento de tecnologia de propriedade intelectual.

### 3. Metodologia

Os experimentos foram realizados em triplicatas no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energias Autossustentáveis (NPDEAS), onde houve o suporte necessário de equipamentos para o cultivo de microalgas e análises realizadas.

#### 3.1 Cultivo de Microalgas

O crescimento de microalgas foi realizado em escala laboratorial, em Erlenmeyer de 2 litros, sob condições de luz e aeração constantes até o fim do cultivo. As microalgas (*Tetradismus obliquus*) foram incubadas em meio CHU modificado, e acompanhadas por análises diária de contagem de número de células, potencial hidrogeniônico (pH), e espectrofotometria, para o desenho da curva de crescimento e verificação do padrão. O meio CHU é um meio sintético de sais orgânicos e inorgânicos, conforme a Tabela 1 de composição, segundo (SANTOS, 2016). O cultivo foi interrompido após atingir a fase estacionária, com aproximadamente  $6,1 \times 10^5$  células/ml.

Tabela 1 - Composição do Meio CHU modificado.

Componente	Fórmula	Concentração final (g.L <sup>-1</sup> )
Nitrato de sódio	NaNO <sub>3</sub>	0,25
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
Fosfato de potássio dibásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,075
Fosfato de potássio monobásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,175
Cloreto de sódio	NaCl	0,025
EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	0,05
Hidróxido de sódio	KOH	0,031
Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01142
Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	$8,82 \times 10^{-5}$

Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44×10 <sup>-5</sup>
Molibdato de sódio di-hidratado	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,1×10 <sup>-6</sup>
Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57×10 <sup>-5</sup>
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,9×10 <sup>-6</sup>

Fonte: SANTOS, 2016

### 3.2 Imobilização de Microalgas

A imobilização foi realizada conforme uma adaptação de Malinoski e Maranhão, 2020. Para a imobilização, 160 ml do cultivo de microalgas foram centrifugados e ressuspensos para um volume de 200 ml, e então misturado com 1 grama de alginato de sódio. Com o auxílio de uma bureta, a solução resultante da mistura foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,4 M sob a agitação constante de um agitador magnético.

Após a imobilização em matriz de alginato as esferas passaram pelo processo de revestimento com quitosana, seguindo a metodologia adaptada de Safari et al. 2015. A quitosana foi particulada por meio da gelatinização iônica com heptamolibidato de amônia, 0,5 g de quitosana foram dissolvidas em uma solução de 2% de ácido acético. As pérolas de alginato, então foram banhadas com a solução sob agitação por 30 min. Depois do tempo decorrido, as pérolas foram inseridas em uma solução de heptamolibidato de amônia a 2 gL<sup>-1</sup>, e logo então, lavadas para a remoção do composto. Após a imobilização, as microalgas imobilizadas foram cultivadas em triplicatas, em reatores de Erlenmeyer de 2 L contendo meio CHU, denominados Reator 1, Reator 2 e Reator 3.

### 3.3 Potencial biorremediador

O potencial biorremediador foi obtido através de análises diárias da concentração total de fosfato presente no cultivo, por meio de kits rápidos de análises da qualidade da água. Assim, então, obtendo uma curva de consumo de nutriente associado ao crescimento do cultivo.

### **3.4 Biomassa seca**

Como não é possível realizar a biomassa seca por meio da filtração convencional, por conta da imobilização, então a metodologia foi adaptada. Amostras diárias das pérolas de microalgas foram secas em estufa a 60 °C durante 24h, e então pesadas no intuito de obter uma curva de crescimento celular.

### **3.5 Microscopia Óptica**

A microscopia óptica foi utilizada para acompanhar visualmente o crescimento das microalgas dentro na esfera de alginato e quitosana, para uma avaliação qualitativa do cultivo de celular.

### **3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de imagem com perspectiva e informações em 3D, usada para confirmar se houve a impregnação de quitosana e auxiliar na avaliação da morfologia, confirmando ou não, a presença de nano estruturas de quitosana na superfície das esferas. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### **3.7 Teste de durabilidade**

Microesferas de microalgas imobilizadas com alginato e quitosana, foram esmagadas e colocadas sob cultivo em meio CHU, após passarem por um período de 5 e 10 meses, condicionadas em temperatura ambiente em Erlenmeyer contendo apenas água deionizada.

## **4 Resultados e Discussão**

### **4.1 Imobilização de microalgas**

O cultivo de microalgas livres foi realizado conforme descrito na metodologia, incubadas em meio CHU, com iluminação permanente de 24h por dia. Após o cultivo atingir o platô, as microalgas foram centrifugadas e ressuspensas em água destilada, para a retirada de compostos contaminantes que poderiam estar no meio de cultivo. As microalgas então foram misturadas

com 1g de alginato de cálcio e gotejadas em uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,4 M sob a agitação constante. As esferas de microalgas com 4mm de diâmetro foram formadas instantaneamente por gelificação ianotrópica, podendo ser facilmente removidas do meio com o auxílio de uma peneira, como mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Microalgas imobilizadas em matriz de alginato e quitosana.

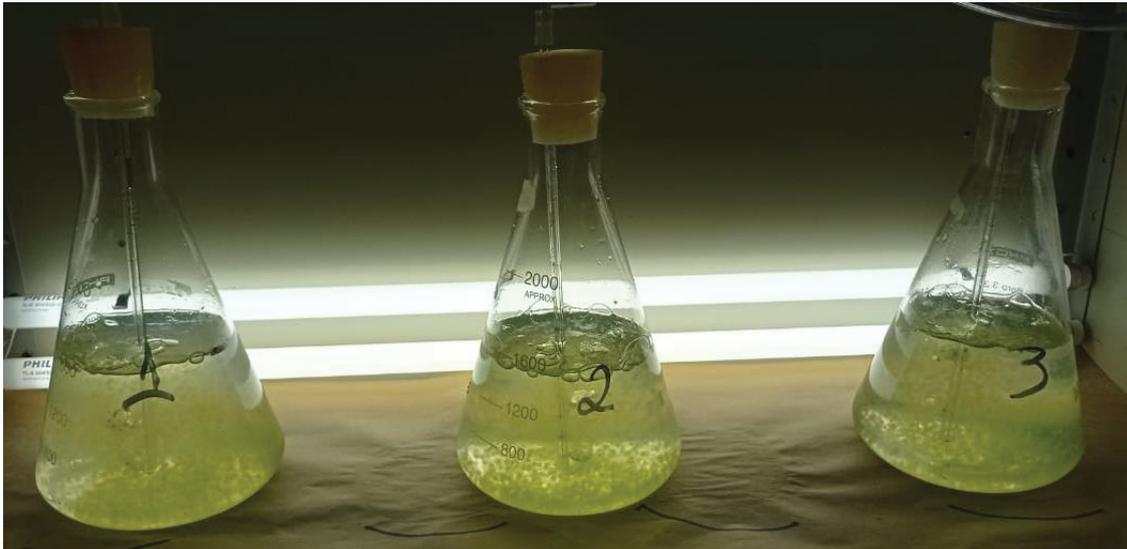


Fonte: O autor (2022)

Seguindo a metodologia adaptada de formação de nanopartículas, as esferas foram banhadas com uma solução de quitosana solubilizada em 2% de ácido acético e logo depois despejadas em uma solução de heptamolibidato de amônia, para a formação de nanoporos de quitosana na superfície das esferas.

Com a imobilização bem-sucedida, então as esferas foram cultivadas novamente em meio CHU, para o estabelecimento dos protocolos e verificação de análises qualitativas, como cor, dissolução e vazamento de células para o meio. Como mostrado na Figura 2, as esferas permaneceram íntegras e houve o aumento da intensidade da cor verde das esferas com o tempo, evidenciando o crescimento das microalgas mesmo imobilizadas.

Figura 2 - Microalgas imobilizadas em matriz de alginato e quitosana cultivadas em meio CHU



Fonte: O autor (2022)

#### 4.2 Microscopia óptica

No intuito de observar como as microalgas estariam distribuídas na matriz e correlacionar com o crescimento da biomassa, as esferas foram submetidas a microscopia óptica. Conforme indicado na Figura 3, 4 e 5, podemos observar as microalgas preenchendo as microcápsulas de acordo com o tempo em um aumento de escada de 400x, as figuras representam os reatores 1, 2 e 3 respectivamente.

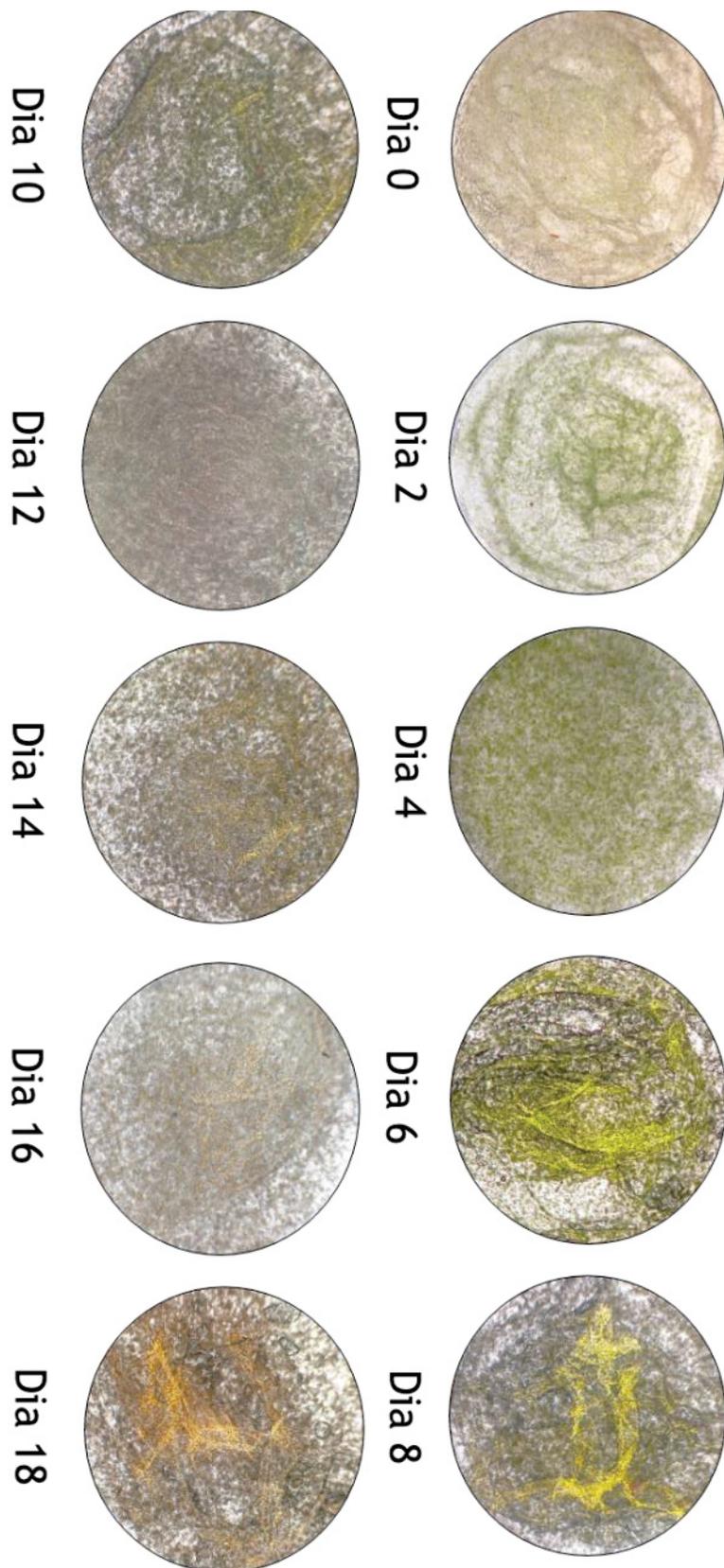
É evidente o crescimento da biomassa de microalgas no centro da esfera, provavelmente favorecido por uma região que permaneceu líquida após a gelificação, evidenciando a formação de cápsulas de microalgas, e comprovando que o desenvolvimento da microalga *Tetradismus obliquus* não foi limitada pela difusão de nutrientes e CO<sub>2</sub>, através da membrana da microcápsula. Entretanto, a matriz da microcápsula pode ter gerado um impacto negativo na densidade celular máxima, limitando o espaço para o crescimento.

A coloração e o preenchimento das esferas, representam as fases do cultivo celular, onde é mostrado que nos primeiros dias, entre o dia 0 e o dia 2, é marcado pela fase Lag, fase de adaptação das microalgas dentro das capsulas e ao meio de cultivo. Enquanto que, entre os dias 4 e 12, é denotado a fase

exponencial de crescimento, marcado pelo aumento da densidade celular dentro das cápsulas. E por fim, entre os dias 14 e 18, a fase de morte celular é expressada pela queda da densidade celular e pela substituição da cor verde muito presente por uma coloração interna mais amarelada.

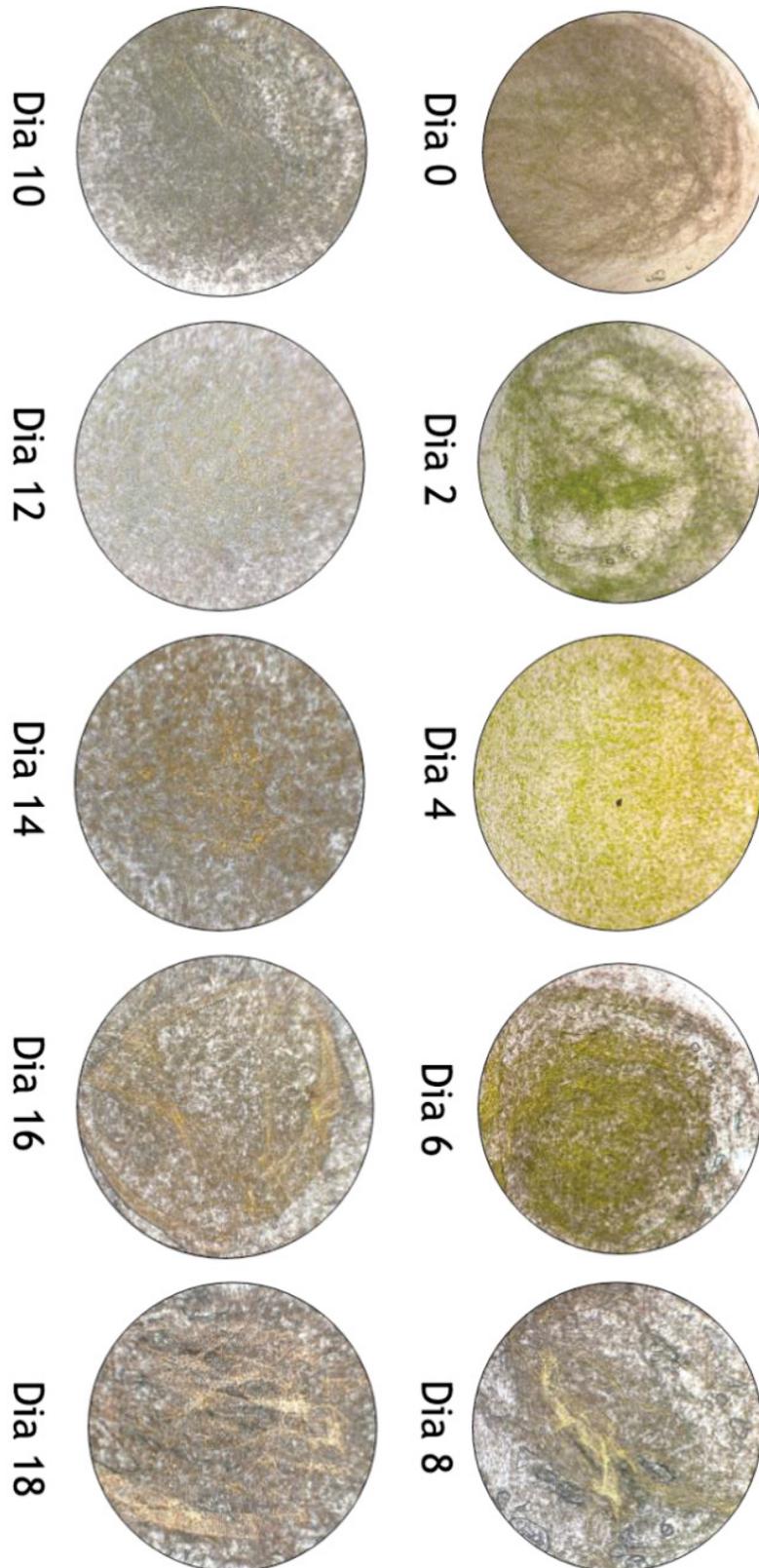
Observando a Figura 5 e comparando os dias 0 e 10, nota-se a diferença da densidade de microalga no interior da microesfera, evidenciada pelo aumento da coloração verde e total preenchimento na microesfera, inferindo um possível ponto de fase exponencial ou até mesmo, um ponto onde a densidade é próxima da densidade máxima. Olhando as Figuras 3 e 4, é presumível chegar em conclusões semelhantes a respeito do aumento da densidade celular.

Figura 3 -Microscopia óptica de microalga immobilizada em matriz de alginato e quitosana em relação ao tempo de cultivo no Reator 1, aumento em 400x



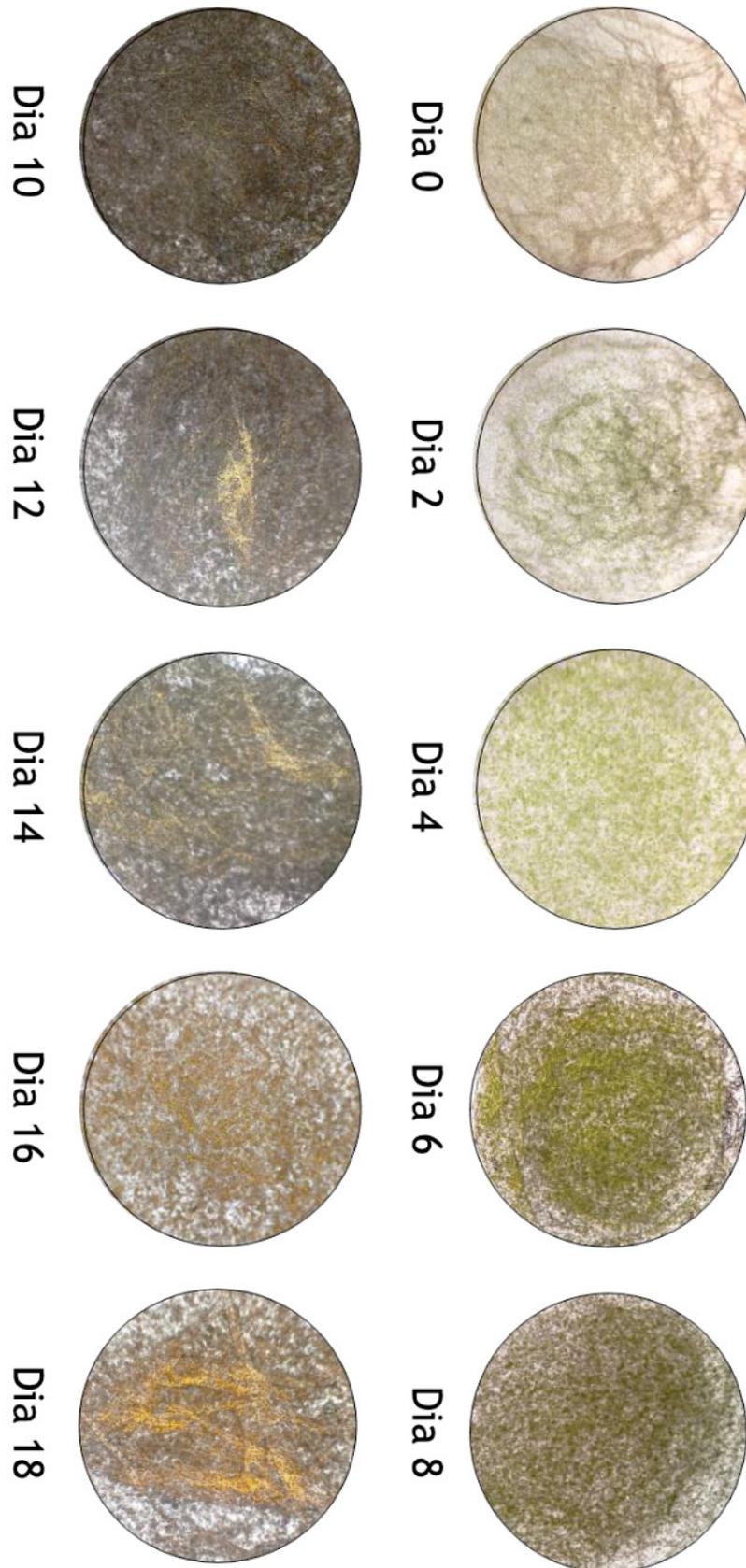
Fonte: O autor (2022)

Figura 1 – Microscopia óptica de microalga immobilizada em matriz de alginato e quitosana em relação ao tempo de cultivo no Reator 2, aumento em 400x.



Fonte: O autor (2022)

Figura 2 – Microscopia óptica de microalga immobilizada em matriz de alginato e quitosana em relação ao tempo de cultivo no Reator 3, aumento em 400x.

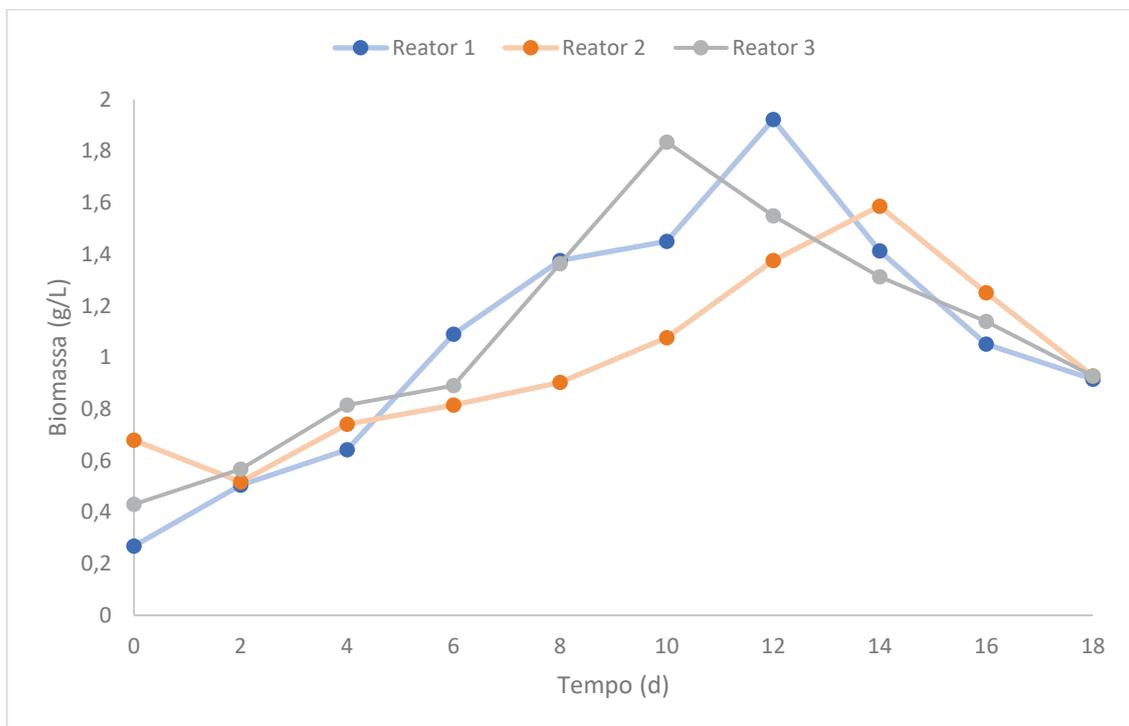


Fonte: O autor (2022)

### 4.3 Biomassa

As curvas de crescimento da microalga em cada reator, estão apresentados na Figura 6. As 3 curvas podem ser correlacionadas com suas respectivas imagens de microscopia óptica, evidenciando as fases de adaptação, crescimento e decaimento celular, etapas naturais dentro do cultivo. Os picos de maior concentração de biomassa, coincidem com os dias onde as esferas de microalgas apresentavam visualmente ter uma maior densidade, assim, certificando a relação direta entre os resultados.

Figure 6 - Concentração de biomassa nos reatores em função do tempo.

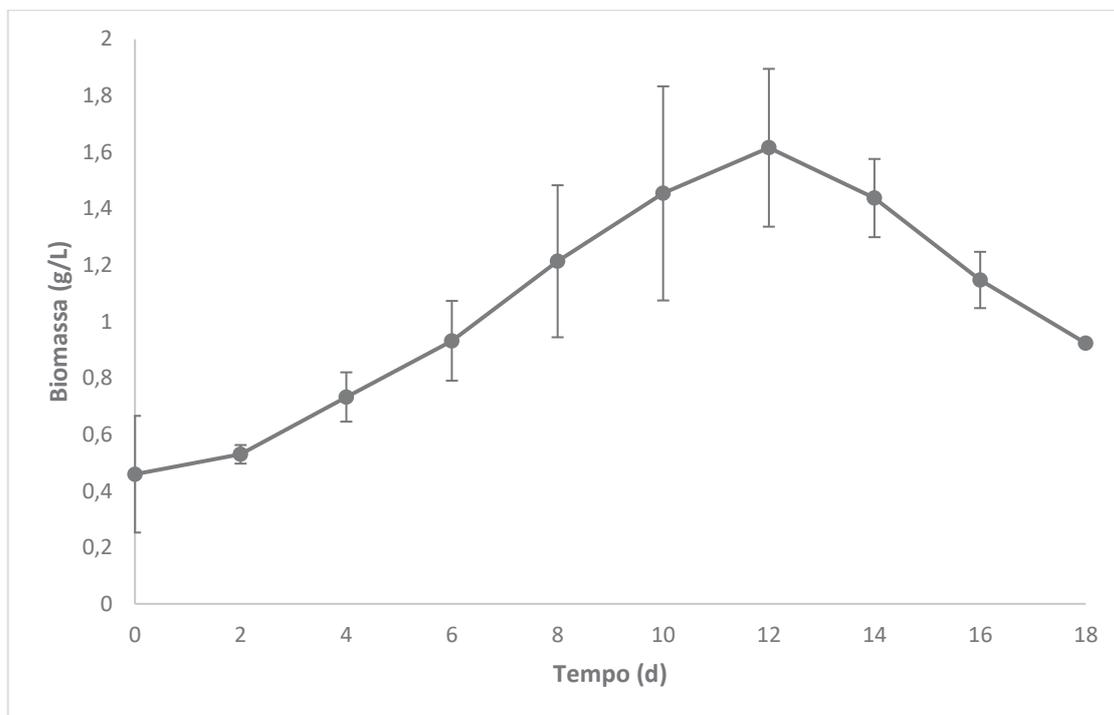


Fonte: O autor (2022)

A concentração média da microalga *T. obliquus* imobilizada em matriz de alginato e quitosana, pode ser observada na Figura 7. Como exposto no gráfico, o tempo médio da duração da fase lag para o cultivo de microalga imobilizada foram de dois dias. O mesmo período foi também exibido por Bauer et al. (2020), no cultivo de *Chlorella minutissima* imobilizada em alginato de cálcio, e diferentemente de Shen et al. (2017), que apresentou uma fase lag de apenas 12 horas, utilizando *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de sódio. O gráfico também retrata um desvio padrão significativo conforme o cultivo se aproxima da

concentração máxima, resultado pelo qual, é justificado pela diferença de tempo entre os cultivos em atingir a concentração máxima, claro quando comparado com a Figura 6.

Figura 3 – Concentração média de microalga nos reatores em função do tempo.

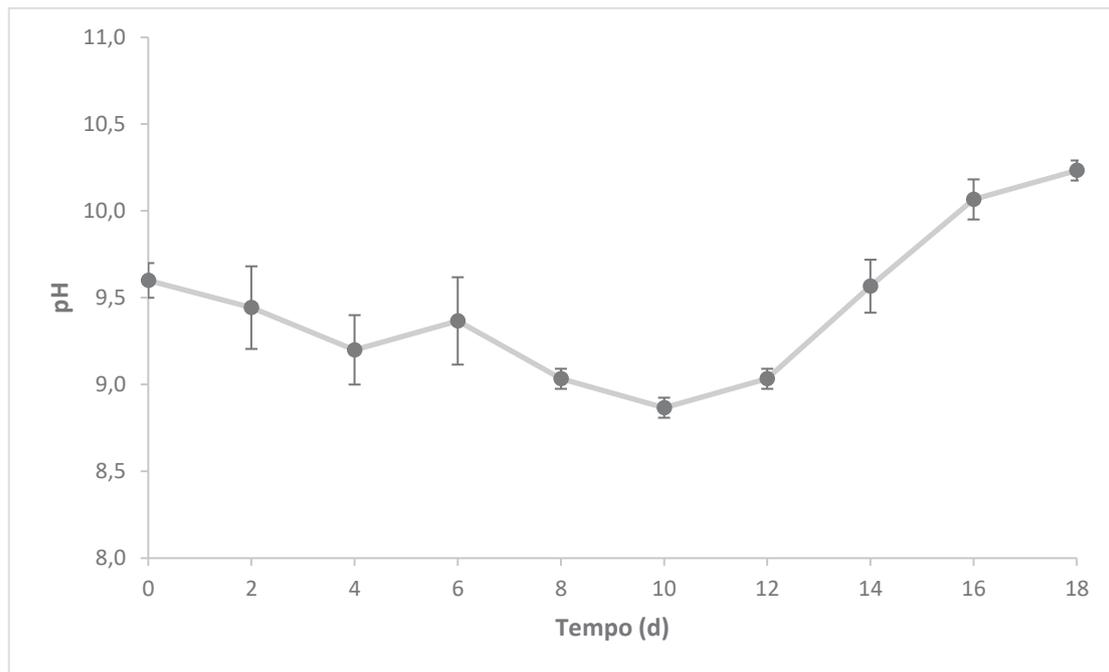


Fonte: O autor (2022)

A concentração celular média máxima de cerca de 1,6 g/L, é maior que a concentração média de cerca de 1 g/L encontrada por Miyawaki et al. (2021), utilizando também a microalga *T. obliquus*, cultivada de forma livre em fotobiorreator do tipo airlift. Contudo, Bauer et al. (2020), atingiu resultados semelhantes utilizando *C. minutissima* imobilizada em matriz de alginato, com rendimentos de 1,3 a 1,6 g/L em apenas 7 dias de cultivo.

O pH do meio era alcalino, possuindo um pH mínimo de 8,8 e um máximo de 10,2 como mostrado na Figura 8. Concomitantemente com o aumento da concentração de microalgas, é comum evidenciar o aumento do pH, isso pode ser explicado devido ao consumo de CO<sub>2</sub> no meio, causado pela atividade fotossintética das microalgas.

Figura 4 – Aumento do pH em função do tempo decorrido no cultivo.



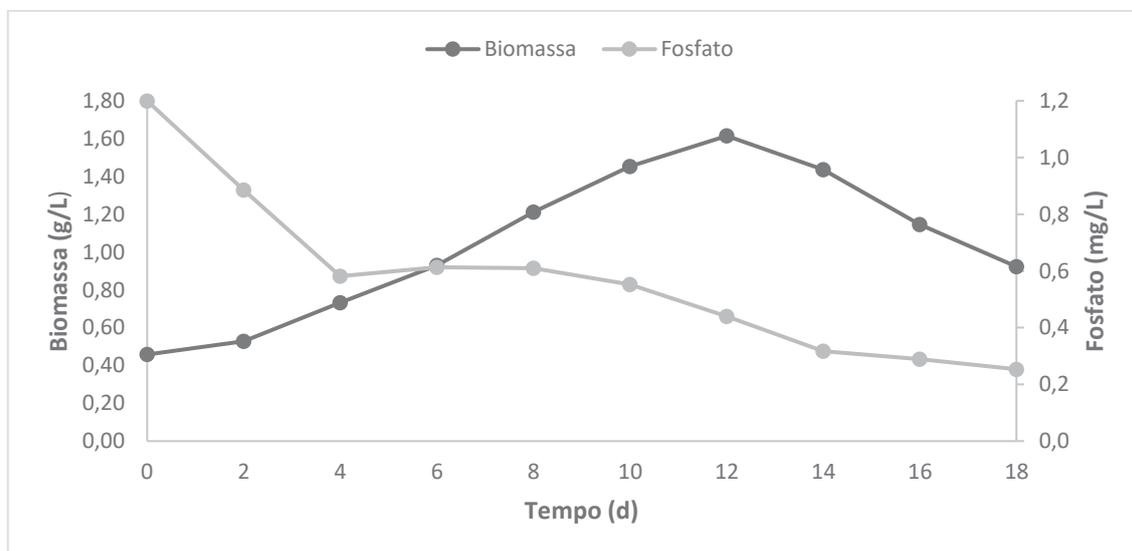
Fonte: O autor (2022)

No entanto, mesmo exposto uma curva padrão no crescimento, o pH elevado pode ter influenciado negativamente o desenvolvimento celular da microalga *T. obliquus*, conforme expressado por, Da Silva et al. (2022) e Lu et al. (2020), o pH maior que 9 altera a solubilidade e a biodisponibilidade de composto fosfatados, como também, favorece a evaporação de compostos nitrogenados no meio aquoso, mais precisamente a amônia (NH<sub>4</sub>)

#### 4.4 Potencial biorremediador

Juntamente com crescimento celular, pode-se observar na Figura 9, a redução da concentração de fosfato no meio, o qual serve de como um substrato, como destacado por Hameed (2007), o consumo de fosfato é convertido em biomassa de celular. Sendo então, admissível afirmar que as curvas demonstram uma complementação, entre o consumo e a geração de fosfato e microalgas, respectivamente.

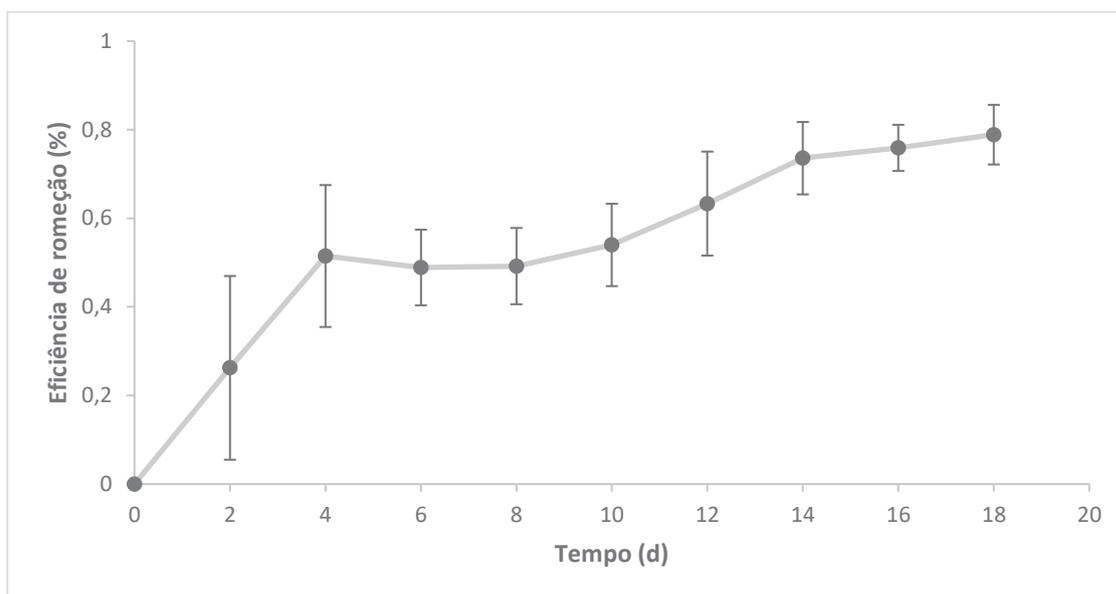
Figura 5 – Comparação entre as curvas de crescimento celular e a de redução do fosfato no meio.



Fonte: O autor (2022)

Apesar disso, as esferas de alginato de cálcio também possuem um importante papel na redução de fosfato no meio. Na figura 10, é exibido a eficiência de remoção acumulada de fosfato. Como provado por Jiménez-Pérez et al. (2004), é possível reduzir a concentração de fosfato, mesmo sem a presença das microalgas, pois parte do mesmo é adsorvido na superfície das microesferas ou precipitado em forma de hidroxiapatita. Esse fenômeno ocorre mais expressivamente nos primeiros instantes do cultivo e menos, conforme o aumento do pH do meio.

Figura 6 – Curva de eficiência de remoção acumulada de fosfato ao longo do cultivo.



Fonte: O autor (2022)

Portanto, de maneira geral, as microalgas imobilizadas apresentam maior taxa de remoção de fosfato do meio, quando comparadas as microalgas livres. A eficiência de remoção de fosfato de quase 80% apresentada neste trabalho, foi semelhante as eficiências encontradas por Aguilar-May; Sánchez-Saavedra (2009) e Filippino et al. (2015) utilizando *Synechococcus elongatus* e *C. vulgaris*, imobilizadas em quitosana e em alginato de sódio, respectivamente. Contudo, Ruiz-Marin et al. (2010) utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus* imobilizada em alginato, conseguiu atingir quase 100% de remoção de fosfato, o mesmo percentual obtido por Filippino et al. (2015), quando alterou o modo de operação para sistema contínuo.

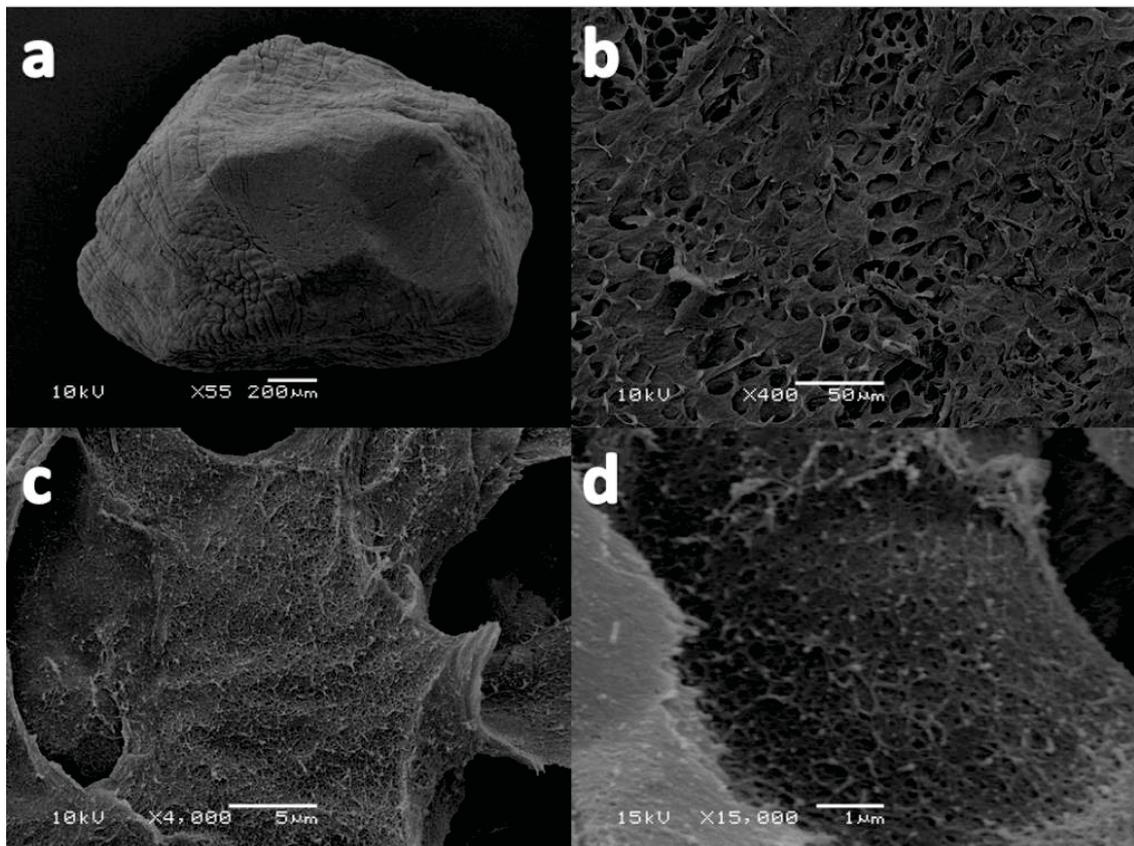
Hameed (2007) também atestou que, a alta densidade celular dentro das microcápsulas pode reduzir a eficiência do tratamento de forma significativa. Uma vez que, a concentração celular elevada impediria a penetração da luz nas esferas, impactando diretamente no metabolismo celular das microalgas.

#### 4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a finalidade de conhecer a conformação estrutural da matriz, foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal

do Paraná (UFPR), o mapeamento da superfície das microesferas, como pode ser observado na Figura 11. Em a) é possível visualizar a microcápsula, e evidenciando suas imperfeições quanto sua forma arredondada. Em b) é notável a presença de poros, os quais são responsáveis pela difusão de nutrientes e gases entre o meio e o interior da microcápsula. É mostrado também que a própria matriz que constitui os poros é porosa, possuindo então outros poros de menor diâmetros, exibidos em c) e d). Mais especificamente em d) podemos visualizar pequenos pontinhos, os quais podem representar a presença de nanoporos de quitosana na superfície do material. A presença de poros e nanoporos, aumenta a área de contato da microcápsula com o meio aquoso, favorecendo os processos de transporte de nutrientes e complexação de sais e metais como relatado por Safari et al. (2015) e Carolina; Gonçalves (2013).

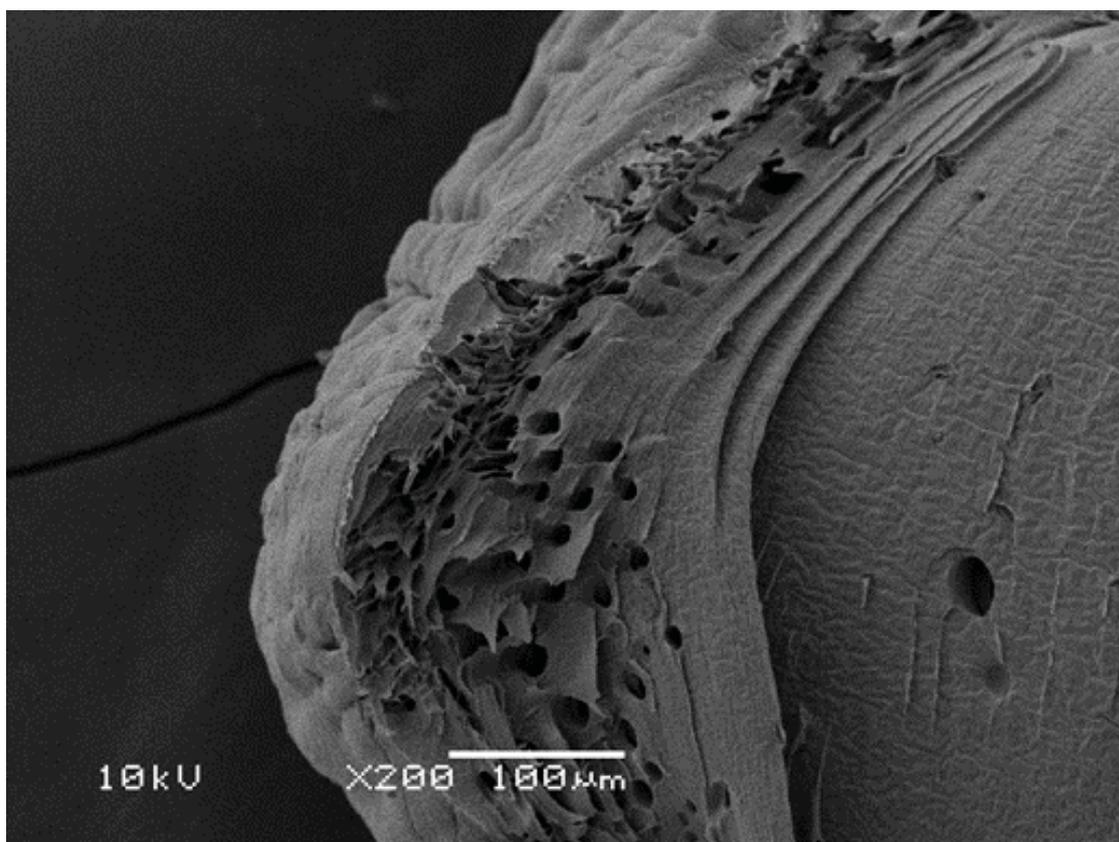
Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície da microesfera de alginato e quitosana.



Fonte: O autor (2022)

Na figura 12, foi realizado o corte transversal da microesfera, assim é possível identificar as duas camadas de revestimento, bem distintas uma da outra. A camada mais exterior feita de quitosana, valida a metodologia para o revestimento da microesfera. A camada mais no interior da esfera, é feita de alginato de sódio, uma camada mais lisa, possuindo uma quantidade visivelmente menor que a camada mais próxima da superfície.

Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura do corte lateral da esfera de microalga imobilizada em matriz de alginato e quitosana.



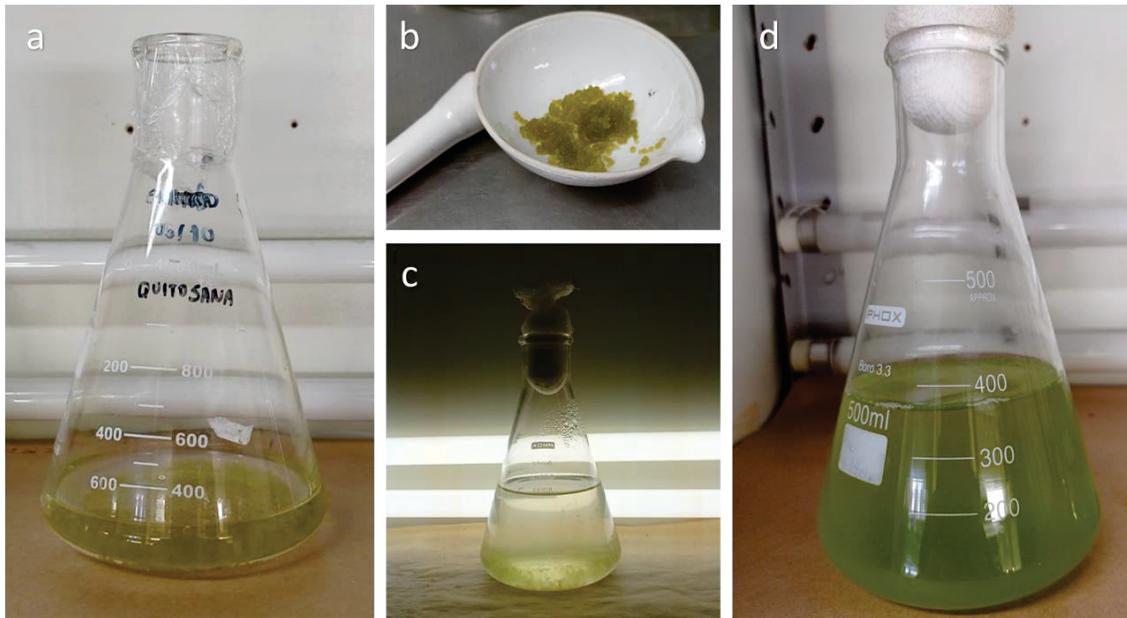
Fonte: O autor (2022)

#### **4.6 Teste de viabilidade**

As microalgas imobilizadas em alginato e quitosana em outubro de 2021, foram mantidas em água deionizada por 5 meses em temperatura ambiente. Como apresentado na Figura 13, em a) as microalgas imobilizadas em água deionizada; em b) 10g de biomassa de microalgas imobilizadas foram esmagadas em um pistilo e então inoculadas em meio CHU com iluminação

constante, como mostrado em c). Após 7 dias da inoculação, foi possível notar visualmente o crescimento de microalga no meio de cultivo.

Figura 9 – Teste de viabilidade das microesferas de alginato e quitosana após 5 meses



Fonte: O autor (2022)

O mesmo processo foi realizado com microalgas imobilizadas em somente alginato, após 10 meses de descanso em água deionizada. Como mostrado na Figura 14, as esferas de microalga mesmo após 10 meses, ainda apresentavam uma aparência saudável.

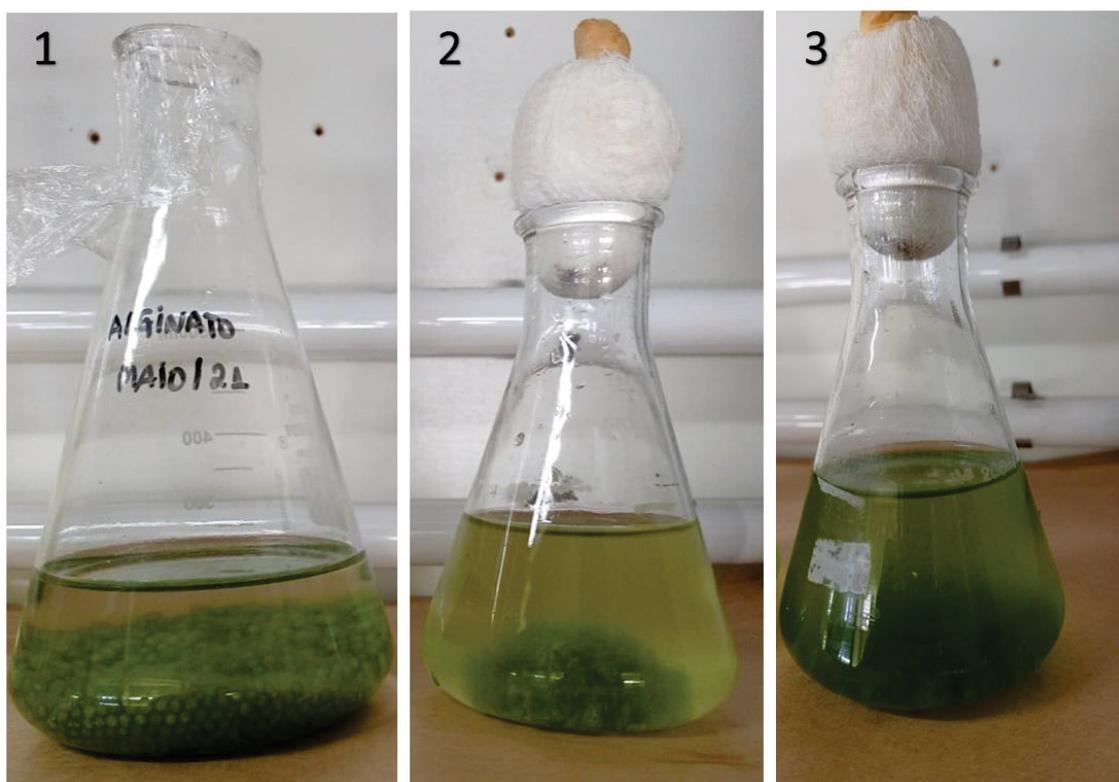
Figura 10 – Esferas de microalga imobilizada em alginato após 10 meses.



Fonte: O autor (2022)

Replicando o processo realizado com as esferas de 5 meses, as esferas 10 meses, apresentadas na Figura 15, também foram esmagadas e inoculadas. Em 1, é exibido as microalgas após 10 meses de condicionamento em água deionizada; em 2, as microalgas esmagadas foram inoculadas e em 3, após 7 dias de cultivo também é possível notar visualmente o crescimento celular no Erlenmeyer.

Figura 11 – Teste de viabilidade das microesferas de alginato após 10 meses.



Fonte: O autor (2022)

O potencial uso do alginato como tecnologia para manter a viabilidade celular também foi comprovado por De Corato et al. (2018), usando 3% de alginato na composição das microesferas, conseguiu manter leveduras viáveis por 14 meses. O aumento da viabilidade é justificado pela matriz de alginato promover maior estabilidade as células, deixando-as mais resistentes a situações de estresse celular.

## 5 Resultados de propriedade intelectual

Os resultados referentes a propriedade intelectual, também colocadas como objetivos específicos deste trabalho, serão dispostas em formato de capítulos. Sendo capítulo II, referente a pesquisa de anterioridade publicada em formato de capítulo de livro, no livro “Microalgas: Potenciais Aplicações e Desafios” e o capítulo III, o artigo de patente depositado no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - INPI.

## 6 Conclusão

A partir do trabalho realizado, pode-se concluir que a imobilização da microalga em matriz de alginato e quitosana é efetiva, e não permite a saída das células para o meio de cultivo, ao mesmo tempo que, a permeabilidade da matriz é suficiente para permitir a difusão dos nutrientes e o crescimento das microalgas no interior das esferas. É possível utilizar já tecnologia de imobilização de microalgas para obter altos rendimentos de biomassa, concomitantemente com o processo de biorremediação de fosfato, pois o potencial de biorremediação das esferas de microalgas é evidente, podemos afirmar que os nutrientes que são potenciais poluidores, são consumidos, ocorrendo assim a biorremediação.

A microscopia eletrônica de varredura, foi essencial para constatar a presença de poros na superfície, as quais otimizam o processo de biorremediação e aumento da densidade celular no interior das esferas. Contudo, ainda se faz necessário a comprovação por imagem de estruturas manométricas, para validação do protocolo de revestimento com nanoquitosana.

O potencial que os biopolímero possuem em manter a viabilidade celular é incontestável, e o estudo de novos protocolos de conservação de biomassa e manutenção de viabilidade, podem gerar alternativas às metodologias caras atuais, como processos de liofilização e congelamento em ultra freezers. Como também, um estudo mais detalhado das microesferas de microalgas, contendo a quantificação da remoção de nitrogênio total, e desempenho em diferentes efluentes e modo de operações.

Outrossim, é importante ressaltar a criação do produto tecnológico, que contribui para o tratamento de efluentes, metodologias simples que diminuem operações unitárias e ainda possibilita a aplicação de seu subproduto em diversas áreas da indústria. Assim, colaborando com a economia circular e ajudando o acesso a água limpa para todos.

## 7 REFERENCIAS

ABDEL-RAOUF N, AL-HOMAIDAN AA, IBRAHEEM IBM (2012). **Microalgae and wastewater treatment**. Saudi Journal of Biological Sciences 19:257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>

AGUILAR-MAY, B.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. D. P. **Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus***. *Journal of Applied Phycology*, v. 21, n. 3, p. 353–360, 2009.

ANA. Agência Nacional de Águas. **Atlas Esgotos revela mais de 110 mil km de rios com comprometimento da qualidade da água por carga orgânica**. 2017. Disponível em < <https://www.ana.gov.br/noticias/atlas-esgotos-revela-mais-de-110-mil-km-de-rios-com-comprometimento-da-qualidade-da-agua-por-carga-organica>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2020.

BAUER, L. M.; RODRIGUES, E.; RECH, R. **Potential of immobilized *Chlorella minutissima* for the production of biomass, proteins, carotenoids and fatty acids**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 25, n. January, p. 101601, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101601>>.

BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. **The Physiology of Microalgae**. Springer International Publishing, 2016.

CAROLINA, L.; GONÇALVES, F. **Fosfatos e ferro : Utilização de *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de sódio**. , 2013.

DANESHVAR E, SIK OK Y, TAVAKOLI S, et al (2021) **Insights into upstream processing of microalgae: A review**. *Bioresource Technology* 329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>.

DA SILVA, P. A. S.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; SEVERO, I. A. **Phycoremediation: Role of Microalgae in Waste Management and Energy Production**. *Waste-to-Energy*. p.511–537, 2022. Cham: Springer International Publishing. Disponível em: <[https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-91570-4\\_17](https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-91570-4_17)>.

DE CORATO, U.; SALIMBENI, R.; DE PRETIS, A.; AVELLA, N.; PATRUNO, G. **Use of alginate for extending shelf life in a lyophilized yeast-based formulate in controlling green mould disease on citrus fruit under postharvest condition**. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 15, n. May 2017, p. 76–86, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.11.006>>.

FILIPPINO, K. C.; MULHOLLAND, M. R.; BOTT, C. B. **Phycoremediation strategies for rapid tertiary nutrient removal in a waste stream**. *Algal Research*, v. 11, p. 125–133, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.011>>.

GIESE EC (2015) **Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio**. CETEM/MCTI.

GOUVEIA L, OLIVEIRA AC (2009) **Microalgae as a raw material for biofuels production**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36:269–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495->

HAMEED, M. S. A. **Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal**. African Journal of Biotechnology, v. 6, n. May, p. 1185–1191, 2007. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57139/45532>>.

JIMÉNEZ-PÉREZ M V., SÁNCHEZ-CASTILLO P, ROMERA O, et al (2004) **Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure**. Enzyme and Microbial Technology 34:392–398. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2003.07.010>

LU W, ASRAFUL ALAM M, LIU S, et al (2020) Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: A review. **Science of the Total Environment** 716:135247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247>

MALINOSKI, L.; MARANHO, L. T. **Imobilização de consórcio de bactérias extraídas da rizosfera de *echinocloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, e seu potencial para a degradação de petróleo**. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 7, p. 50373–50395, 2020.

MIYAWAKI B, MARIANO AB, VARGAS JVC, et al (2021) **Microalgae derived biomass and bioenergy production enhancement through biogas purification and wastewater treatment**. Renewable Energy 163:1153–1165. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.045>.

MOHSENPOUR SF, HENNIGE S, WILLOUGHBY N, et al (2021) **Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review**. Science of the Total Environment 752:142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. **Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater**. Bioresource Technology, v. 101, n. 1, p. 58–64, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>>. .

SAFARI, J.; AZIZI, F.; SADEGHI, M. **Chitosan nanoparticles as a green and renewable catalyst in the synthesis of 1,4-dihydropyridine under solvent-free conditions**. New Journal of Chemistry, v. 39, n. 3, p. 1905–1909, 2015b. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4NJ01730G>>.

SAJJADI, B.; CHEN, W. Y.; RAMAN, A. A. A.; IBRAHIM, S. **Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 97, n. November 2017, p. 200–232, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>>.

SANTOS, B. **Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa demicroalgas com carbono orgânico**. UFPR, p. 104, 2016.

SHEN, Y.; GAO, J.; LI, L. **Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal**. *Bioresource Technology*, v. 243, p. 905–913, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>>

SILVA, M. C. C. DE P. **Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio**. Universidade Federal de CampinaGrande - UFCG, p. 53, 2011.

UNESCO. **Relatório Mundial das Nações Unidas Sobre Desenvolvimento dos Recursos Hídricos 2017**. p. 8, 2017.

### 1.3 ARTIGO 3 – MATRIZES POLIMÉRICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE MICROALGAS APLICADAS AO TRATAMENTO DE EFLUENTES: UMA ANÁLISE DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES

Artigo publicado em formato de capítulo de livro, na editora Merida Publisher, no livro intitulado “Microalgas: potenciais aplicações e desafios” no ano de 2021.

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-8-1.c8>

#### Resumo

A utilização de microalgas para o tratamento de efluentes vem obtendo destaque nas últimas décadas. Dessa maneira, novas tecnologias e processos se mostram satisfatórios no que concerne a eficiência de biorremediação. Uma das opções utilizadas está baseada na imobilização de microalgas em matrizes poliméricas, a qual visa otimizar as características intrínsecas desses microrganismos para o tratamento de águas residuárias. Portanto, o objetivo do presente capítulo consiste em analisar o estado da arte do uso de matrizes poliméricas para a imobilização de microalgas aplicadas a biorremediação de efluentes por meio da prospecção tecnológica de patentes. O estudo está centrado na busca por patentes em diversas bases de dados de acesso aberto, utilizando códigos booleanos combinados com palavras-chave específicas que contemplam o processo em estudo. O critério adotado está baseado no sistema de classificação internacional CPC (*Cooperative Patent Classification*). À vista disso, foi analisada a evolução histórica da atividade de patenteamento, o número de patentes depositadas por países e os principais cessionários. Muitos trabalhos científicos são publicados frequentemente na literatura sobre essa temática, no entanto, estudos prospectivos são pouco investigados, o que pode fornecer informações valiosas a respeito da maturidade tecnológica de um dado processo.

**Palavras-chave:** algas, biopolímeros, imobilização celular, inovação.

#### 1. Introdução

As microalgas têm sido amplamente aplicadas para diversos fins biotecnológicos em detrimento do impacto ambiental oriundo das atividades humanas nos últimos anos. Por essa razão, houve a necessidade de buscar formas de tratamento e mitigação dos danos causados aos ecossistemas, principalmente aquáticos. A biorremediação tem sido utilizada para este propósito, a qual é definida como o uso de microrganismos no tratamento e transformação de contaminantes de uma matriz ambiental; entretanto, quando há o uso específico de microalgas, este processo é denominado de

ficorremediação (EMPARAN *et al.*, 2019).

O processo de ficorremediação tem o objetivo de remover ou tratar os contaminantes, consumindo-os como nutrientes para produção de biomassa, e de degradar ou transformar os compostos químicos tóxicos em compostos inertes (SARKAR; DEY, 2021).

Nos últimos anos, com o aumento da população e o uso descontrolado dos recursos naturais, estão surgindo muitos problemas relacionados à qualidade da água e saneamento básico. O tratamento de efluentes é realizado pelas estações de tratamento, e a sua purificação consiste basicamente em três etapas: tratamento primário, secundário e terciário (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

O tratamento primário é responsável pela retirada dos sólidos suspensos, por meio de processos físico-químicos, como floculação e decantação, conseguindo remover cerca de 40% de todos os compostos orgânicos dos efluentes. O tratamento secundário utiliza principalmente os processos biológicos, para remover todos os compostos orgânicos e a maior parte possível dos compostos inorgânicos. Quando não for possível remover todas as impurezas presentes no efluente, é então necessário a realização do tratamento terciário, através de processos químicos ou biológicos, é responsável por remover substâncias específicas presentes na água (VON SPERLING, 2007).

As águas residuárias que precisam ser tratadas, são constituídas principalmente por compostos carbonáceos orgânicos (determinados pela demanda bioquímica de oxigênio – DBO) e compostos inorgânicos, como fosfatos, amônio, bicarbonato, sódio, dentre outros (ABDEL-RAOUF *et al.* 2012). Quando a matéria orgânica é o principal poluente, preferencialmente, deve-se utilizar processos biológicos para o tratamento, pois são mais simples, eficientes e com um custo relativamente mais baixo quando comparado aos demais processos (MOHSENPOUR *et al.*, 2021).

Como o tratamento de águas residuais é imprescindível, a busca por novas tecnologias de tratamento é urgente. A imobilização celular é um processo que consiste em aprisionar ou fixar células ou enzimas em uma matriz através de interações físico-químicas. A utilização de biomassa imobilizada para tratamento de efluentes está sendo cada vez mais estudada (CHEIRSILP *et al.*,

2017; XIE *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2020; KUBE *et al.*, 2021), pois a técnica tende a aprimorar as características intrínsecas dos microrganismos, como por exemplo, a remoção de DBO, retenção de sólidos, além de eliminar a etapa de sedimentação. Logo, o sistema de células imobilizadas é capaz de aumentar a eficiência e reduzir os custos dos processos biológicos (GIESE, 2015).

Considerando estes aspectos, os processos baseados em microalgas imobilizadas são alvo de inúmeras investigações envolvendo questões de sustentabilidade e econometria, as quais evidenciam as tendências, problemas que necessitam de soluções inovadoras, o nível de maturidade tecnológica, além de auxiliar na tomada de decisão dos investidores (TABERNEIRO *et al.*, 2013). Essas pesquisas geralmente são refletidas em muitas publicações de artigos científicos, relatórios técnicos e patentes. No entanto, os documentos de patentes contêm uma riqueza incomparável de informações com grande relevância industrial. As patentes representam as inovações em um país ou organização e são um acordo entre o inventor e o governo ou agência. A utilização desses documentos é importante para mapear os níveis de desenvolvimento de uma área específica para fins industriais. A título de exemplificação, a análise de patentes ajuda a determinar a novidade e suas invenções, tanto na propriedade intelectual, quanto na competitividade tecnológica, ao determinar os pontos fortes e fracos do concorrente, bem como na estimativa de sua evolução ou declínio em um determinado período (WIPO, 2016).

Portanto, o objetivo do presente capítulo consiste em analisar o estado da arte do uso de matrizes poliméricas para a imobilização de microalgas aplicadas a biorremediação de efluentes por meio da prospecção tecnológica de patentes. Até onde se sabe, a análise de documentos de patentes sobre a temática proposta neste trabalho raramente foi discutida na literatura atualmente disponível.

## **2. Principais matrizes utilizadas na imobilização celular: Uma breve revisão**

A matriz de imobilização, comumente chamada de suporte, deve possuir algumas características básicas dependendo da sua aplicação, sendo as

principais: Não ser tóxica para as células, resistente a ataques químicos e a degradação biológica, alta capacidade de retenção celular, apresentar maleabilidade a solicitações mecânicas (tensão de cisalhamento, compressão, pressão interna de gases, entre outros), e principalmente, permitir a difusividade de substratos e produtos. Existem três categorias principais quanto a origem do material que pode ser utilizado como suporte, podendo ser definidas como: (i) materiais poliméricos naturais (quitosana, alginato e celulose); (ii) polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliestireno e poliuretano); e (iii) materiais inorgânicos (alumina, zircônia e sílica) (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Entretanto, os polímeros naturais baseados em quitosana e alginato são enfatizados neste estudo, uma vez que eles são uma classe de suportes amplamente empregados em procedimentos de imobilização celular em função da sua diversidade, custo relativamente baixo e facilidade na degradação, não causando danos ambientais.

## 2.1 Quitosana

A quitosana é um copolímero biodegradável derivado da quitina, e que apresenta propriedades termoplásticas. É amplamente utilizada em encapsulamentos de microrganismos ou como carreadores de fármacos. Diferentes métodos para formação de esferas de quitosana já foram descritos na literatura, porém o mais empregado é o método de gelificação iônica. O processo consiste basicamente no gotejamento de uma solução ácida de quitosana, em um recipiente contendo uma segunda solução rica em íons monovalentes, como o  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Na}^+$  (SILVA *et al.* 2011).

A quitosana também pode assumir o papel de polímero de revestimento, com a finalidade de adicionar propriedades mecânicas, como resistência, melhoramento da ligação entre matrizes e suportes, além de poder ser modificada para sua forma de nanoquitosana, a qual possui nanoporos que aumentam a superfície de contato e favorecem reações químicas e biológicas (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2016; MALINOSKI e MARANHO, 2020).

## 2.2 Alginato

O alginato é um biopolímero proveniente da parede celular das algas marrons, geralmente encontrado comercialmente como alginato de cálcio e alginato de sódio. Capaz de formar estruturas coloidais, o composto tem despertado interesse do setor tecnológico. O alginato já vem sendo utilizado na saúde e na alimentação, principalmente na formulação de cápsulas farmacêuticas e alimentos, atuando como espessante e estabilizante. O uso do biopolímero como agente de encapsulamento celular apresenta muitas vantagens. O composto forma uma matriz biodegradável, não tóxica, e permite a difusão de nutrientes e gases pela matriz, mantendo a viabilidade dos microrganismos que ali estão retidos (SILVA, 2011; VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2016).

## 3 Metodologia

Com o propósito de compreender o panorama da propriedade intelectual no escopo deste estudo, foi realizada uma análise de patentes utilizando a plataforma de busca Espacenet, desenvolvida pelo Escritório Europeu de Patentes (*European Patent Office*, EPO). Essa base de dados contempla mais de 120 milhões de publicações de patentes registradas no mundo todo, fornecendo informações de atividades de invenção em um determinado período de tempo. O Espacenet agrupa documentos internacionais em famílias, com base na coleção de dados do Tratado de Cooperação de Patentes (*Patent Cooperation Treaty*, PCT), definido pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual (*World Intellectual Property Organization*, WIPO).

A busca de patentes foi realizada em agosto de 2021, selecionando a opção de pesquisa avançada. O método consistiu em um procedimento de três etapas: (1) busca usando os códigos de classificação do CPC (*Cooperative Patent Classification*), baseado em uma organização categórica de seções (<https://www.cooperativepatentclassification.org/index>). Tais códigos são padronizados para classificar as patentes de acordo com diferentes áreas tecnológicas, proporcionando um alto nível de detalhamento nas pesquisas com resultados mais precisos. O montante de códigos selecionados para o estudo proposto é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Códigos para prospecção de patentes.

<b>Códigos</b>	<b>Descrição</b>
C12N1/12	Unicellular algae; Culture media therefor (as new plants A01H 13/00)
C02F2003/001	Using granular carriers or supports for the microorganisms
C02F3/108	Immobilizing gels, polymers or the like
C12N5/0012	Cell encapsulation
C12N11/04	Entrapped within the carrier, e.g. gel or hollow fibres
C12N11/06	Attached to the carrier via a bridging agent
C12N11/08	The carrier being a synthetic polymer
C12N11/10	The carrier being a carbohydrate
C12N11/14	Enzymes or microbial cells immobilized on or in an inorganic carrier

Posteriormente, (2) usou-se palavras-chave e suas variantes, incluindo os termos em inglês "*microalgae*", "*immobilization*", "*cell immobilization*" e "*bioremediation*". O propósito dessa etapa consiste em refinar a pesquisa, bem como, reduzir o conjunto de dados para documentos mais específicos. O truncamento "+" das palavras foi realizado a fim de recuperar diferentes variações relevantes vinculadas a um dado termo, além da combinação dos operadores booleanos "AND", "OR" e "NOT".

Devido a abrangência do tema, (3) os documentos resultantes da pesquisa foram compactados e exportados para o *software Microsoft Office Excel 2019* para realização de posterior análise mais detalhada. Os dados foram expostos de maneira visual, considerando indicadores como ano de publicação,

país de origem e inventores.

Ao final da realização da pesquisa foi possível gerar gráficos e tabelas com os documentos de patentes encontradas nos bancos de dados a partir da metodologia descrita acima.

#### 4 Resultados e discussão

Considerando a combinação entre os códigos C12N1/12 e C12N11/04 e utilizando o operador booleano “AND”, esta busca foi a que melhor atendeu o objetivo proposto neste estudo, contemplando 25 documentos de patentes pertencentes a 15 famílias, as quais correspondem aos critérios de pesquisa, como mostrado na Figura 1. O número de famílias pode englobar diversas publicações de uma mesma patente em diferentes países e idiomas.

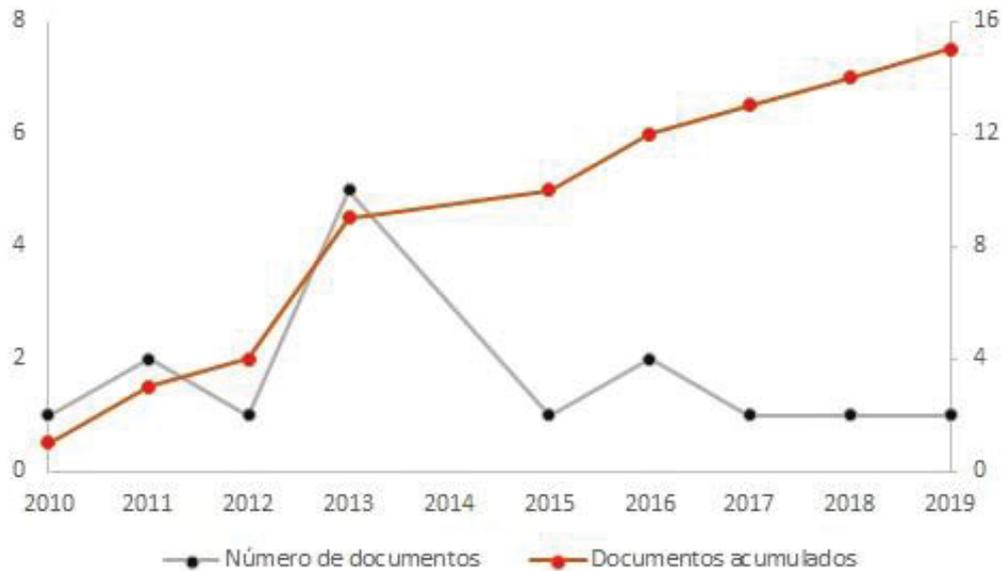
Figura 1- Combinações entre os códigos de classificação de patentes.

C12N1/12	C02F2003/001	C02F3/108	C12N5/0012	C12N11/04	C12N11/06	C12N11/08	C12N11/10	C12N11/14	Patentes
X									3186
	X								1404
		X							627
			X						279
				X					1364
					X				321
						X			2044
							X		1546
								X	2068
X	X								3
X		X							1
X			X						0
X					X				0
X				X					15
X				X		X			4
X				X		-			11
X								X	10

Conforme mostrado na Figura 2, com base no número de documentos acumulados, pode-se observar que existe uma tendência no aumento de depósito de patentes na área estudada, com poucas concessões a longo dos últimos 10 anos. A partir dessa observação, é possível constatar que existem poucas patentes atuais sobre imobilização de microalgas em matrizes poliméricas para o tratamento de efluentes. Além disso, existe uma tendência e

necessidade de depósitos de novos produtos e processos inventivos.

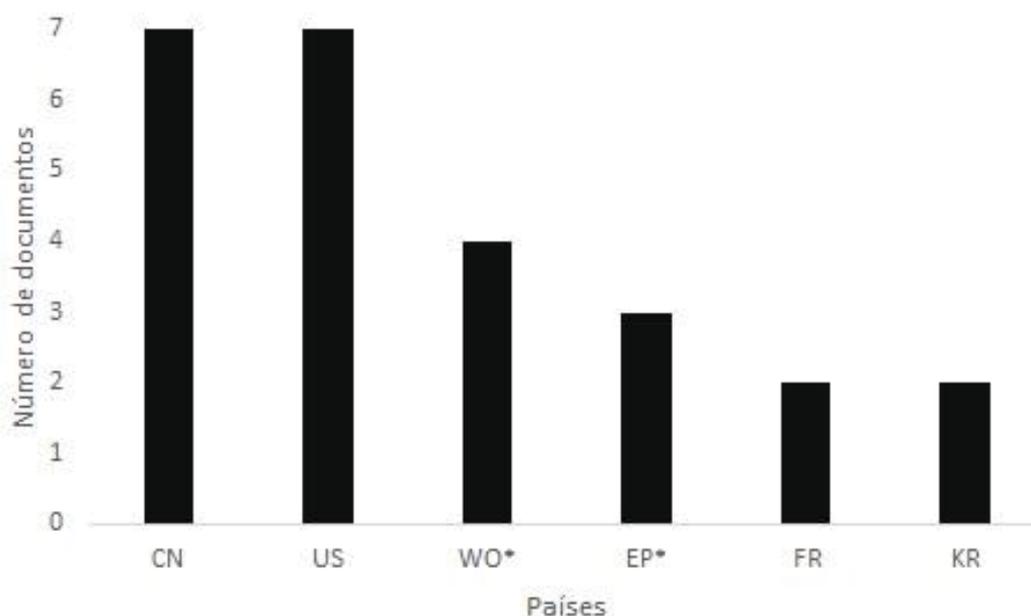
Figura 2 - Evolução do depósito de patentes nos últimos anos



Um fator considerável na busca por depósito de patentes é o critério CPC, que é apontada como base para avaliação do desempenho tecnológico e estatísticas sobre propriedade intelectual. Dessa maneira, a Figura 3 representa o gráfico referente ao número de patentes depositadas por países. É possível notar que diante da quantidade de patentes analisadas, a disputa está entre China e Estados Unidos. Isso deve-se ao fato de que estes países estão frequentemente presentes no mercado tecnológico atual quando comparados aos demais países.

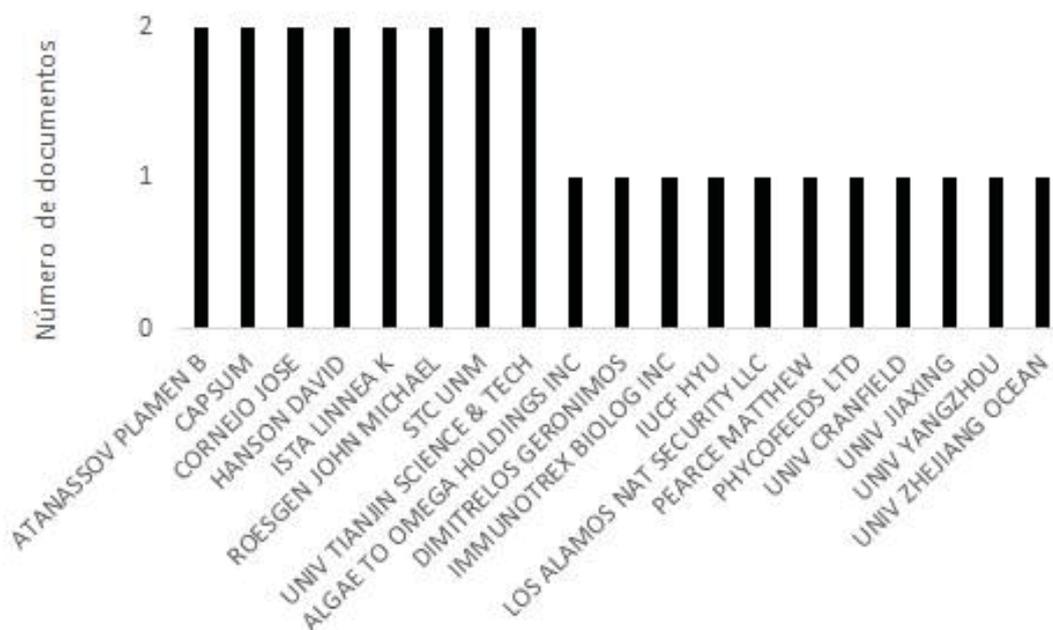
Embora exista um número consideravelmente baixo de patentes na área em estudo, nota-se um grande interesse da indústria em inovar nesse campo, visto que o setor industrial, em geral, apresenta lidera o maior número de patentes concedidas, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 3 - Número de documentos por país



Nota: \*WO se refere aos pedidos de patentes pedidos pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI/WIPO).

Figure 4 - Principais depositantes.



Após um estudo individual de cada patente, foram selecionadas àquelas que apresentam maior aderência ao tema. Nesse sentido, a patente representada pelo código EP3104684A1, pertencente a empresa Phycofeeds LTD, refere-se à utilização de alginato ou pectina como uma matriz de

imobilização. O texto apresenta o processo de execução da imobilização das microalgas. Além disso, ele descreve o método para a obtenção dos principais constituintes do material aglutinador (alginato e pectina), sendo descrito o tempo de processamento e as principais fontes de origem desses constituintes, utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* no processo de imobilização.

Outra patente que se assemelha a este estudo é a WO201628366A1, pertencente a empresa francesa CAPSUM, a qual sugere a utilização da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. O documento também descreve o processo de imobilização de células unicelulares de plantas, e especialmente no caso de algas, utilizando matriz de alginato de sódio. Nessa patente, foi reivindicado que o encapsulamento minimiza contaminações no cultivo e facilita a obtenção de produtos de interesse, como os utilizados no mercado de cosméticos, compostos farmacêuticos e *agrifoods*, assim como na obtenção de ácidos graxos. O documento cita três experimentos, os quais comprovam o aumento da resistência mecânica do processo de encapsulamento e a permeabilidade da membrana de alginato.

Por outro lado, a patente chinesa CN106277646A, pertencente a Universidade Jiaying, apresenta a utilização de processos simbióticos na imobilização, sendo citados como algas, a *Chlorella* sp. e o *Phytoplankton* sp., e como fungos, o *Ganoderma lucidum* e o *Pleurotus* sp. aprisionados em uma matriz de alginato de sódio. O documento destaca o processo de purificação de biogás produzido através da digestão anaeróbica de dejetos suínos, utilizando a simbiose entre o consumo de CO<sub>2</sub> e a remoção de nitrogênio e fósforo, obtendo um processo de purificação de biogás e concomitantemente o tratamento secundário da água.

## **5 Desafios e perspectivas futuras**

O uso de sistemas baseados em microalgas imobilizadas para o tratamento de efluentes tem sido relatado na literatura com certa frequência. No entanto, raramente surgiu uma nova tecnologia a partir de décadas de pesquisa para usar intencionalmente esses microrganismos como um processo efetivo. Por essa razão, diversas propostas, incluindo a imobilização de microalgas em matrizes poliméricas naturais e combinações de processos para o tratamento

simultâneo de efluentes, apresentam potencial para uso comercial no futuro.

Existem muitos desafios para o emprego de microalgas em sistemas de fitorremediação. Primeiramente, a compreensão dos detalhes técnicos das estações de tratamento biológico de efluentes é muito limitada, o que pode resultar em um custo relativamente elevado em relação aos métodos convencionais de tratamento químico, os quais são mais simples e baratos. Considerando o volume de águas residuárias a serem tratadas, qualquer aumento no custo operacional pode dificultar a venda de novas tecnologias. Em segundo lugar, a proporção relativamente baixa de remoção de certos contaminantes, associado ao maior tempo de retenção nas plantas de tratamento de efluentes, elevam os custos e a relutância dos envolvidos em operar sistemas que naturalmente não são muito precisos e dependem essencialmente de fatores ambientais imprevisíveis. Tudo isso torna o emprego de processos biológicos, principalmente mediados por microalgas, uma tecnologia de nicho.

Contudo, considerando os procedimentos operacionais atualmente disponíveis, essa rota tecnológica pode ser integrada como uma estratégia complementar em sistemas tradicionais de tratamento de efluentes. Hoje, as empresas estão exigindo cada vez mais tecnologias ou processos com sustentabilidade ambiental e econômica para a maioria dos aspectos da sociedade moderna.

Os processos baseados em microalgas imobilizadas apresentam diversas vantagens como o controle e proteção do microrganismo dominante dentro do polímero empregado; é possível projetar e otimizar um biorreator para diferentes sistemas de imobilização tratar paralelamente vários contaminantes no efluente; as microalgas usam energia solar e requerem quantidades mínimas de outros insumos/recursos para operação; os sistemas de imobilização são fáceis de manusear em grande escala, não oferecem riscos à saúde humana, são ambientalmente corretos, não produzem poluição secundária e seus produtos finais podem ser transformados em matéria-prima para a produção de diversos bioprodutos, como biocombustíveis, bioenergia, biofertilizantes e químicos, que podem agregar valor ao processo. Além disso, as microalgas imobilizadas podem ser produzidas em sistemas modulares, híbridos e compactos, gerando menos lodo e sendo menos dispendiosos em manter.

Independente destes aspectos, uma série de barreiras técnicas inerente a tecnologia de imobilização propriamente dita ainda persiste e precisa ser melhor estudada, como o aprimoramento e otimização dos polímeros de encapsulamento para aplicações específicas, desenvolvimento de processos em larga escala e alterações no comportamento metabólico das espécies de microalgas. Solucionar esses gargalos aumentará o potencial futuro de microalgas imobilizadas em instalações de tratamento de efluentes.

## **6 Conclusões**

Estudar a prospecção de patentes para mapear as tendências tecnológicas globais no campo-alvo demonstram as lacunas que podem ser exploradas e complementadas para o desenvolvimento de trabalhos futuros com base em duas perspectivas principais. A primeira está baseada no fato de que as análises de patentes podem ser usadas para examinar os indicadores de colaboração entre instituições e requerentes, permitindo uma visão mais detalhada do grau de interação entre os setores público e privado, bem como parcerias globais para diferentes tipos de tecnologia. Adicionalmente, mapear e quantificar as patentes protegidas pode ser proveitoso para obter informações sobre sua relevância econômica em um determinado local. Com relação ao segundo ponto de vista, aspectos relacionados ao processamento de microalgas devem ser abordados considerando os custos de capital. Por exemplo, uma discussão mais aprofundada sobre o projeto bem-sucedido de biorreatores para o cultivo de células imobilizadas merece mais atenção, pois poucas tecnologias foram desenvolvidas até o momento. Portanto, a análise de documentos de patentes contribui para o avanço considerável em pesquisa, desenvolvimento e inovação, bem como para a tomada de decisão por parte dos investidores na área de processos de microalgas imobilizadas, pois um entendimento do cenário atual é útil em fornecer uma melhor previsão das mudanças tecnológicas.

## 7 Referências

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.

CAO, S.; TENG, F.; WANG, T.; LI, X.; LV, J.; CAI, Z.; TAO, Y. Characteristics of an immobilized microalgae membrane bioreactor (iMBR): Nutrient removal, microalgae growth, and membrane fouling under continuous operation. **Algal Research**, v. 51, 102072, 2020.

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

EMPARAN, Q.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: A review. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 17, n. 1, p. 889–915, 2019.  
ESPACENET. <https://worldwide.espacenet.com/> (Acesso em 15 de agosto de 2021).

GIESE, E. C. **Potencial Biotecnológico do Uso de Microrganismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio**. 2015.

KUBE, M.; FAN, L.; RODDICK, F. Alginate-immobilised algal wastewater treatment enhanced by species selection. **Algal Research**, v. 54, 102219, 2021.

MALINOSKI, L.; MARANHO, L. T. Imobilização de consórcio de bactérias extraídas da rizosfera de *echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, e seu potencial para a degradação de petróleo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50373–50395, 2020.

MOHSENPOUR, S. F.; HENNIGE, S.; WILLOUGHBY, N.; ADELOYE, A.; GUTIERREZ, T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 752, n. September 2020, p. 142168, 2021. The Authors. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>>.

SARKAR P.; DEY, A. Phycoremediation – An emerging technique for dye abatement: An overview. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 147, p. 214–225, 2021.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. 2o ed. EDITORA EDGARD BLUCHER LTDA, 2001.

SILVA, M. C. C. de P. **Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella* sp. imobilizada em matriz de alginato de cálcio**.

Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2011.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E. M.; GALAN, M. A. Microalgae Technology: A Patent Survey. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, 2013.

VIJAYALAKSHMI, K.; GOMATHI, T.; LATHA, S.; HAJEETH, T.; SUDHA, P. N. Removal of copper(II) from aqueous solution using nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 440–452, 2016.

VON SPERLING, M. **Basic Principles of Wastewater Treatment**. IWA Publishing, 2007.

XIE, B.; GONG, W.; YU, H.; TANG, X.; YAN, Z.; LUO, X.; GAN, Z.; WANG, T.; LI, G.; LIANG, Z. Immobilized microalgae for anaerobic digestion effluent treatment in a photobioreactor-ultrafiltration system: Algal harvest and membrane fouling control. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 139-148, 2018.

WIPO. World Intellectual Property Organization, 2016. **Patent Landscape Report on Microalgae-Related Technologies**. Disponível em: <https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4042&plang=FR>. Acesso em: 04 de outubro de 21.

#### 1.4 **ARTIGO 4 – FOTOBIORREATOR MODULAR HÍBRIDO (TERRA-ÁGUA) E/OU CARTUCHOS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS LIVRES OU IMOBILIZADAS EM BIOPOLÍMEROS APLICADO NO PROCESSO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES, GERAÇÃO DE PRODUTOS E SEUS USOS**

Artigo publicado em forma de patente, depositado no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), com data de publicação em 03 de março de 2022, sob o número de registro BR1020210245867.

### **Resumo**

A invenção encontra seu campo de aplicação dentre as tecnologias para produção de biomassa (bioenergia) e que diminuam ou eliminem o impacto ambiental. A presente patente divulga um tipo de plataforma destinada ao tratamento de forma simultânea de águas residuárias a partir de microalgas livres ou imobilizadas em matrizes biopoliméricas, projeto de novos fotobiorreatores, obtenção e utilização dos bioprodutos que servem como matéria-prima e/ou insumos finais de interesse industrial. As vantagens do bioprocessamento consistem em soluções tecnológicas que possibilitem a biorremediação, fácil remoção das microalgas do efluente, aprimoramento das características intrínsecas do microrganismo, exploração comercial dos produtos formados e, essencialmente, a fácil ampliação dos sistemas de cultivo, sua operação e manutenção, podendo ser implementado em novas instalações ou adaptado a processos já existentes.

#### **1. Campo da Invenção**

[001]. A presente invenção pertence ao campo técnico de tecnologias para produção de biomassa (energia renovável) e que diminuam ou eliminem o impacto ambiental. Em particular, a invenção refere-se a uma nova plataforma de tratamento de águas residuárias a partir de microalgas imobilizadas em biopolímeros e, substancialmente, de fotobiorreatores híbridos e/ou modulares. Adicionalmente, o presente pedido trata de bioprodutos obtidos através do dito bioprocessamento da presente invenção e sua utilização como fonte de biomassa (bioenergia) e insumos de interesse industrial.

#### **2. Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica**

[002]. Nos últimos anos, houve um aumento exponencial na contaminação de corpos hídricos devido às atividades antrópicas, que incluem o lançamento constante de efluentes domésticos, agrícolas e industriais. Este grave problema

ambiental ocasiona a eutrofização acelerada dos ecossistemas aquáticos, principalmente pela descarga de substâncias orgânicas e inorgânicas ricas em fósforo e nitrogênio.

[003]. Embora diversos acordos internacionais tenham sido propostos recentemente e estejam presentes em quase todas as agendas científicas, sociais ou políticas no mundo todo, as questões associadas ao gerenciamento dos recursos hídricos impõem sérios riscos à sua disponibilidade e qualidade. Assim sendo, é imperativo abordar este problema insustentável.

[004]. Os processos convencionais de tratamentos primários e secundários aplicados aos efluentes são uma necessidade e atualmente envolvem uma variedade de procedimentos físicos e químicos, fornecendo um produto final aparentemente limpo. Entretanto, a maioria destes métodos demandam etapas mais complexas e custosas, além de co-gerar consideráveis quantidades de lodo sem a destinação ambiental adequada. Um ponto crítico para o desenvolvimento bem-sucedido de um método para mitigar a carga poluente de águas residuárias é produzir pouca ou nenhuma poluição secundária.

[005]. Em contrapartida, os procedimentos biológicos foram propostos durante as últimas décadas e posteriormente empregados para o de tratamento secundário e/ou terciário de efluentes. Em geral, tratar biologicamente estes resíduos envolvem principalmente o uso de lodos ativados. No entanto, este tipo de sistema apresenta várias falhas inerentes como a baixa concentração de biomassa e onerosidade. Algumas tecnologias recentes foram desenvolvidas para aprimorar a bioatividade do lodo, que por limitações de custo e/ou engenharia complexa, são consideradas pouco atrativas.

[006]. Uma das alternativas que vem ganhando considerável atenção para o tratamento de águas residuárias está baseada no uso de microalgas. Existe um consenso entre pesquisadores, desenvolvedores e industrialistas de que estes microrganismos oferecem uma infinidade de vantagens na remoção do excesso da carga poluidora presente nos efluentes, o que torna possível o seu descarte final eficaz e econômico, com o menor impacto ambiental.

[007]. Dentre os incontáveis benefícios das microalgas, destacam-se a elevada

eficiência fotossintética, rápida taxa de crescimento, alta produtividade de biomassa, e produção de inúmeros metabólitos de valor agregado. Além disso, considerando as características da biomassa, os processos mediados por microalgas são vistos como potenciais tecnologias para converter efluentes em insumos empregados na indústria química, petroquímica, energética, alimentícia, farmacêutica e agrícola.

[008]. Apesar da existência de muitas rotas tecnológicas utilizando microalgas para a purificação de águas residuárias, até o presente momento, elas têm sido limitadas sob certos aspectos, porém não impedidas para o escalonamento industrial. As principais barreiras consistem na (i) relativa ocupação de espaço para o cultivo, (ii) dificuldade na separação das frações sólido/líquido pós-tratamento do efluente, (iii) perdas celulares e (iv) descarte da biomassa remanescente.

[009]. A técnica de imobilização celular é uma estratégia promissora para transpor essas dificuldades. A imobilização de microalgas está fundamentada em fixar ou aprisionar as células em uma matriz através de interações físico-químicas. Dentre os diversos métodos existentes, a imobilização através da técnica de gelificação iônica é a que apresenta maturidade necessária para aplicação em escala. Em adição a estas considerações, a imobilização apresenta as seguintes vantagens competitivas: as células são facilmente coletadas por filtração simples, que tem baixo consumo de energia, devido ao tamanho das esferas formadas em comparação as microalgas livres, variando de 1 a 8 mm; maior concentração celular e preservação das mesmas, evitando a contaminação; maior estabilidade térmica; biodegradabilidade; alta atividade metabólica; baixo excesso de lodo gerado; redução de custos de manutenção dos equipamentos (biorreatores); as esferas contendo as microalgas imobilizadas podem ser reutilizadas, reduzindo a necessidade subcultivar a cultura estoque com frequência; e possui um efeito notável na purificação de águas residuárias, removendo compostos nitrogenados e fosfatados, inclusive metais pesados.

[010]. Independente destes aspectos, quando as microalgas imobilizadas são aplicadas em um fluxo hídrico, as questões de escoamento ainda são um

inconveniente. Por essa razão, é crucial utilizar sistemas que sustentem o crescimento adequado destes microrganismos e atinjam elevadas produtividades, como é o caso dos fotobiorreatores fechados. A maioria das configurações de fotobiorreatores de microalgas imobilizadas conhecidas do estado da técnica, adotam equipamentos que operam com propósitos específicos para atender as peculiaridades dos resíduos. Além disso, esses fotobiorreatores apresentam informações técnicas limitadas (por exemplo: complexidade de parâmetros), o que resulta em despesas elevadas. Considerando o enorme volume de efluente a ser tratado, qualquer aumento no custo operacional dificulta a venda de uma nova tecnologia para as estações de tratamento de águas residuárias.

[011]. Diante do exposto, há uma demanda latente em desenvolver novas tecnologias com duplo papel: solucionar os aspectos problemáticos dos fotobiorreatores para cultivar microalgas imobilizadas em concomitância com a biorremediação das águas residuárias.

[012]. Portanto, uma plataforma que considere simultaneamente o tratamento de águas residuárias empregando microalgas imobilizadas em matrizes biopoliméricas, o projeto de fotobiorreatores inovadores, incluindo sistemas híbridos (terra-água) e/ou cartuchos modulares, e a obtenção de bioprodutos que servem como matéria-prima e/ou produtos finais de muitos consumíveis úteis para a indústria é algo ainda não existente no atual estado da técnica.

[013]. Existem diversas rotas tecnológicas objetivando processos de biorremediação ambiental utilizando microalgas. A técnica de imobilização, por outro lado, tem sido explorada como uma estratégia prospectiva para melhorar a colheita de células de microalgas em águas residuárias; também é eficaz para controlar o crescimento microalgal em fotobiorreatores. Contudo, o tratamento de águas residuárias empregando microalgas imobilizadas associado ao desenvolvimento de novos fotobiorreatores híbridos e/ou cartuchos modulares e uso dos produtos ainda não foi relatado e possui grande potencial para implementação industrial.

[014]. Alguns pedidos de patente foram depositados na tentativa de viabilizar os

processos acima descritos. Dentre os documentos existentes no estado da técnica, os seguintes podem ser citados:

[015]. A patente chinesa TWM497670U, intitulada “*Immobilized microalgae particles*” relata um método para a imobilização de grânulos de microalgas em uma estrutura de alginato com a finalidade majoritária de conservar o microrganismo, mantendo-o viável, e para impedir que as microalgas se movam para o meio aquoso.

[016]. A patente americana US20120225472A1, intitulada “*Preservation and composition of bioprocess algae for production of lipids, seedstock, and feed*” descreve a produção de uma microalga imobilizada e métodos para a cultura, colheita, preservação, armazenamento e usos.

[017]. A patente chinesa CN112522109A, intitulada “*Microalgae immobilization method, immobilized microalgae and application in water pollution treatment*” refere-se a um método de imobilização de microalgas e uso no tratamento da poluição de corpos hídricos, utilizando um suporte esponjoso.

[018]. A patente francesa WO2012171123A1, intitulada “*Method using immobilized algae for production and harvest of algal biomass and products*” descreve composições, artigos, aparelho, métodos e sistemas para o cultivo de microalgas imobilizadas, colheita e processamento.

[019]. A patente chinesa CN107988079A, intitulada “*Compound algae preparation for removing nitrogen and phosphorus pollutants*” cita um método de uso combinado de várias algas para a remoção de poluentes utilizando a técnica de imobilização em alginato de sódio.

[020]. A patente chinesa CN110343605A, intitulada “*A kind of method of immobilized cells culture processing breeding wastewater*” refere-se a um método de tratamento de águas residuárias da aquicultura com microalgas imobilizadas em alginato.

[021]. A patente americana US20190241853A1, intitulada “*Compositions comprising microalgae and methods of producing and using same*” compreende um processo de microalgas encapsuladas em alginato e/ou quitosana e um

elemento flutuante para manter as células no meio, o qual é caracterizado pela própria partícula microalgal.

[022]. Os documentos de patentes acima descritos apresentam diversas inconsistências comuns, caracterizadas essencialmente pela ausência de um sistema adequado de cultivo das microalgas imobilizadas, o que é pouco atrativo para a exploração comercial. Sob outra perspectiva, alguns destes documentos desconsideram o tratamento de efluentes e/ou a aplicabilidade das esferas, seja diretamente ou como insumo intermediário para a formação de outros produtos, os quais são de interesse industrial.

[023]. Em termos de fotobiorreatores, muitos modelos isoladamente já são conhecidos no estado da técnica. No entanto, os equipamentos ou aparatos registrados são considerados frequentemente como sistemas complexos, mais difíceis de construir e operar, além de necessitar de substancial área para ocupação, exigindo maiores investimentos de capital.

[024]. Um dos principais direcionamentos do presente invento consiste no projeto de fotobiorreatores, particularmente sistemas híbridos (terra-água) e/ou cartuchos modulares, para o cultivo robusto das microalgas imobilizadas. Concluiu-se, portanto, que através da busca de anterioridade, não existem documentos de patentes propondo uma plataforma para o tratamento de águas residuárias com microalgas imobilizadas em biopolímeros, projeto de novos fotobiorreatores, obtenção de produtos e seus usos de forma simultânea.

### **3. Descrição da abordagem do problema técnico**

[025]. No presente invento, os principais problemas técnicos a serem solucionados frente ao que existe no estado da técnica estão relacionados ao (i) tratamento das águas residuárias; (ii) descarte da biomassa residual; (iii) contaminação; (iv) dificuldade na separação das frações sólido/líquido pós-tratamento do efluente; e (v) perdas celulares, ocupação de área e complexidade operacional dos cultivos, conforme se segue:

[026]. (i) Os recursos hídricos contaminados por esgoto doméstico, agrícola e/ou industrial, possuem suas características alteradas, portanto são capazes de carregar e disseminar doenças ou substâncias tóxicas para a saúde humana e

animal. As estações de tratamento de efluentes apresentam dificuldades em remover o mínimo necessário de poluentes, e muitas vezes acabam oferecendo recursos hídricos de má qualidade. Além disso, os efluentes com alta carga de nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo e matéria orgânica, sofrem eutrofização causada pelo crescimento acelerado das algas presentes no meio, as quais consomem praticamente todo o oxigênio dissolvido na água, resultando em perdas ecológicas consideráveis.

[027]. (ii) Alguns sistemas de tratamento de efluentes possuem problemas quanto à destinação dos resíduos gerados pós-tratamento, como é o caso dos sistemas de lodos ativados, cujo processo não tem uma disposição ambientalmente correta. Os flocos do lodo são formados por agregados contendo bactérias, fungos, protozoários e algas. Por ser um material altamente contaminado, não pode ser disposto em aterros e nem serve para adubagem do solo; então a alternativa mais comumente utilizada consiste em processos de incineração.

[028]. (iii) Existem diferentes sistemas de cultivos de microalgas para a produção de biomassa e o tratamento de efluentes. Dentre eles, o cultivo aberto é o mais popular para a cultura de microalgas em escala comercial. Contudo, possui diversas desvantagens, incluindo a influência do meio externo, como oscilações frequentes de temperaturas, contaminações e perdas por evaporação, resultando em baixa produtividade de biomassa ou até mesmo a perda da cepa microalgal.

[029]. (iv) Um dos grandes desafios do uso de microalgas no tratamento de efluentes é garantir que a biomassa seja convenientemente recuperada. Caso as microalgas livres sejam adicionadas no efluente a ser tratado, o problema reside na forma de recuperação das células suspensas, a qual é dispendiosa e pode representar até 30% dos custos totais de produção. Atualmente, esse gasto é devido ao intenso consumo energético na etapa de colheita, caracterizada geralmente pela centrifugação da biomassa, em função do meio ser altamente diluído, da necessidade de processar grandes volumes e do pequeno tamanho das células.

[030]. (v) similarmente ao descrito no item acima (iv), a problemática inerente a recuperação da biomassa ocasiona perdas das células em suspensão. Em geral, adota-se o uso de sistemas de cultivo baseados em fotobiorreatores fechados para solucionar esse inconveniente. Porém, a maioria dos equipamentos requer maiores extensões de área, enquanto a carga de trabalho e os custos operacionais associados à sua manutenção, desmontagem e limpeza são substancialmente altos.

[031]. Os principais gargalos destacados acima podem ser melhorados ou solucionados com a plataforma de tratamento de efluentes a partir de microalgas imobilizadas em biopolímeros cultivadas em novos fotobiorreatores e suas aplicações, objeto da presente invenção.

[032]. Portanto, de modo a resolver os problemas técnicos, um dos objetivos do invento aqui revelado é fornecer um tipo de sistema que facilite a remoção das microalgas do efluente por filtração simples, com a utilização de peneiras e crivos, permitindo minimizar o consumo energético, devido ao considerável tamanho das partículas (esferas de aproximadamente 5 mm) em relação às células livres. Adicionalmente, a diminuição do volume dos fotobiorreatores, gerando estações mais compactas e significativamente mais baratas, também é uma dificuldade a ser superada.

[033]. Outro aspecto a ser solucionado com a esta patente consiste em aprimorar as características intrínsecas das microalgas, conferindo-lhes melhor resistência a contaminações e variações de temperaturas, aumentar a capacidade de remoção de compostos nitrogenados, fosfatados, compostos orgânicos dissolvidos e também metais pesados, bem como eliminar a formação de lodo e qualquer outro tipo de material residual.

[034]. Em adição, após tratarem o efluente, é possível ter diversas aplicações para as esferas contendo as microalgas. Elas podem ser recuperadas e reutilizadas no processo e/ou novamente imobilizadas, servindo como matéria-prima para o processamento de biocombustíveis, essencialmente biodiesel, aditivos para formulações de ração animal e uso como biofertilizante agrícola.

[035]. A invenção aqui descrita é passível de ser explorada industrialmente, pois

foi elaborada para atender a demanda de obter um processo de biorremediação através da técnica de imobilização celular, servindo um instrumento propulsor para o desenvolvimento sustentável. Nesta patente conseguiu-se unir as vantagens da aplicabilidade de novos fotobiorreatores em qualquer sistema de tratamento de efluentes com a exploração comercial dos produtos formados.

[036]. Em suma, a novidade reside nas soluções tecnológicas que permitem aumentar facilmente o processo de cultivo, sua operação e manutenção, podendo ser implementado em novas instalações ou adaptado a processos já existentes.

[037]. Para tornar os objetos, soluções técnicas, novidades e vantagens da presente patente mais aparentes, a invenção é ainda descrita em detalhes com referência às modalidades a seguir.

#### **4. Descrição detalhada da Invenção**

[038]. As características da plataforma de tratamento de efluentes a partir de microalgas imobilizadas, fotobiorreatores e produtos, objeto da presente invenção, serão perceptíveis a partir da descrição minuciosa que se fará a seguir.

[039]. O presente bioprocessos possibilita diferentes cultivos de microalgas (fotoautotrófico, fotoheterotrófico, heterotrófico e mixotrófico), e em diversos modos de operação (batelada, batelada alimentada e contínuo).

[040]. O processo aqui revelado ocorre por meio das etapas de: (i) imobilização celular; (ii) projeto de fotobiorreatores específicos; (iii) tratamento de águas residuárias; e (iv) produtos obtidos e seus usos.

[041]. (i) Em um aspecto detalhado, a imobilização é realizada pelo método de gelificação ionotrópica. A partir de um cultivo de microalgas livres pré-existente no estado estacionário, é então realizada a floculação, decantação ou centrifugação das mesmas, e então ressuspensas com água deionizada, destilada ou ultrapura, em um volume de até o máximo duas vezes do volume original. Após a ressuspensão, é então adicionado 0,8-3% do agente gelificante (alginatos, quitosana, agarose, celulose ou carragena) a solução de microalgas, a qual deve ser gotejada em um meio catiônico como, por exemplo, contendo

íons  $\text{Ca}^+$  ou  $\text{Na}^+$ . Após esse processo, as microalgas estão imobilizadas na matriz escolhida, envoltas por uma membrana gelatinosa, em formato de esferas.

[042]. Uma vez que há a formação das esferas contendo as microalgas aprisionadas, as mesmas podem ser revestidas por uma camada de nanopartículas poliméricas (nanoquitosana, nanocelulose e nanocarragena). As esferas são banhadas com uma solução de polímeros naturais dissolvidos em 1-3% de ácido acético, submetidas a agitação contínua por 0,5 a 1 h. Depois do tempo decorrido, as esferas são colocadas em uma solução de heptamolíbdate de amônio, em torno de  $2 \text{ g L}^{-1}$ , e então lavadas para a remoção de compostos residuais.

[043]. (ii) Após o processo de imobilização celular, o cultivo é realizado em fotobiorreatores específicos. Os sistemas consistem em unidades básicas de produção de microalgas, projetadas para aumentar facilmente o processo de cultivo, sua operação e manutenção. Os fotobiorreatores ora propostos são passíveis de variáveis construtivas, ou seja, pode-se alterar os seus formatos (geometrias) de acordo com a sua aplicação.

[044]. O fotobiorreator híbrido (terra/água), um dos equipamentos do invento, inclui 4 unidades principais, conforme apresentado na Figura 2. Em uma perspectiva detalhada, o referido sistema compreende basicamente os seguintes componentes: dois módulos 1A e 1B ( $0,3 \times 1,5 \times 2,2 \text{ m}$ ), construídos em material plástico arranjados horizontalmente, formando as superfícies inferior e superior, seladas entre si; um módulo constituído de uma unidade *air-lift* ( $1 \times 1 \times 1 \text{ m}$ ), com volume útil variando entre 500 a 1000 L; e uma zona desgaseificadora com tubos transparentes verticais de PVC ( $0,3 \times 3 \text{ m}$ ), na qual uma delas recebe a alimentação de ar (*riser*) e outra não (*downcorner*). O filme plástico é fabricado a partir de folhas de polietileno transparente de baixo custo com 0,15 mm de espessura.

[045]. Conforme indicado na Figura 2, 1A (terrestre) e 1B (flutuante) detalham os módulos utilizados em lagos e corpos d'água. O sistema com camada transparente superior permite o aproveitamento luminoso e com baixa

necessidade de estruturas de sustentação ou suporte. Cada um dos módulos “2” (Figura 2) foi dimensionado para atender até 20 módulos 1A ou 20 módulos 1B, totalizando uma área de cultivo de 21 m<sup>3</sup>. Como os módulos são acoplados entre si, o sistema é notavelmente versátil, permitindo a produção de inoculo e posterior produção utilizando o mesmo conjunto funcional. Destaca-se o contraste deste sistema de cultivo fechado aos equipamentos com tubos transparentes ou painéis que demandam estruturas de sustentação, implicando em custos elevados. O principal diferencial deste fotobiorreator consiste na modularidade do sistema e da flexibilidade de aplicação em qualquer terreno, bem como sobre lagos ou reservatórios de efluentes. Ao utilizar reservatórios como suporte para os módulos, o sistema faz um bom uso de área já disponível sem custos adicionais e grandes obras civis para estruturas de sustentação.

[046]. No caso do fotobiorreator de cartuchos modulares (Figuras 4 e 5), outro equipamento do presente invento, o sistema provê tubos de PVC para as conexões e PVC cristal para os tubos que comportam as microalgas, de modo a evitar interferências na incidência de luz e facilitar o mecanismo fotossintético das células microalgais. Como alternativa de construção, pode-se utilizar tubos de aço ou de acrílico, dando-se preferência para o último devido a evitar a oxidação de materiais metálicos que podem interferir no processo de tratamento. O diâmetro da tubulação de entrada na bomba é dn 100 (dn = diâmetro nominal), equivalente a 100 mm; e na linha de saída de bombeamento até os cotovelos é dn 50. As válvulas são utilizadas para o controle do fluxo de efluente, permitindo que o sistema de tratamento do efluente possa ser realizado de modo contínuo. Nos tubos ascendentes ocorre uma redução do diâmetro da tubulação, dn 40. Após os tubos de tratamento, retorna-se ao diâmetro original (dn 50) encaminhando em sentido a saída do sistema.

[047]. O volume de tratamento de um tubo, considerando o diâmetro da tubulação e seu comprimento de 2 metros equivale ao tratamento de aproximadamente 2,5 L, assim o volume total de tratamento para a configuração piloto é de 30 L. O sistema pode ser aumentado ou diminuído considerando uma nova disposição de feixe de tubos, desde que seja determinada uma nova bomba que suporte o funcionamento do sistema.

[048]. O bombeamento foi representado pela utilização de uma bomba centrífuga, porém este equipamento pode ser substituído por uma bomba diafragma ou de deslocamento positivo. Como não haverá a passagem das microalgas ou esferas imobilizadas pelo sistema de bombeamento, não há possibilidade de perda de biomassa devido ao sistema de bombeamento, assim aumentando o espectro de escolha de possíveis bombas a serem utilizadas.

[049]. Apesar de as microalgas estarem imobilizadas ainda poderia ocorrer a passagem de esferas ao longo da tubulação, para evitar esse problema foram equipadas válvulas tanto na parte superior quanto na inferior, que possuem um sistema de filtragem por malha metálica furada. Esse sistema evita sujeiras decorrentes do processo de tratamento primário e impede que esferas passem para a saída do sistema.

[050]. (iii) Normalmente, os cultivos de microalgas imobilizadas possuem por objetivo a produção de biomassa, compostos energéticos ou tratamento de efluentes. A taxa de crescimento das microalgas imobilizadas é menor, quando comparada às microalgas livres, porém, as microalgas imobilizadas permanecem mais tempo em crescimento exponencial e demoram a atingir o platô (fase estacionária), assim possuindo uma maior capacidade biorremediadora.

[051]. O sistema proposto faz parte de um tratamento secundário de efluente, o qual não visa substituir os métodos convencionais de tratamento, e sim complementá-los. O tratamento pode ser realizado em batelada, batelada alimentada ou contínuo. Os reatores de leito fixo ou fluidizado são ideais para o tratamento de efluentes utilizando microalgas imobilizadas; basicamente, é constituído de uma coluna vertical de secção circular, onde as microalgas são contidas. Assim, o efluente é bombeado para dentro do fotobiorreator, tratado pelas microalgas e retirados pela extremidade oposta. Os principais compostos a serem biorremediados pelas microalgas no tratamento de efluentes são os derivados de nitrogênio e fósforo. Dependendo do modo de operação, é possível alcançar mais de 90% de remoção desses nutrientes.

[052]. (iv) Após a utilização no sistema de tratamentos de efluentes, as

esferas de microalgas não são consideradas como um resíduo, e sim como um subproduto que serve como matéria-prima para outros processos. As microalgas imobilizadas podem ser consideradas como fontes de ácidos graxos e hidrocarbonetos para produção de biocombustíveis, como o biodiesel de microalga. Como as microalgas também são ótimas fontes de proteínas, as esferas também podem ser empregadas como aditivos na alimentação de animais, ou utilizadas na formulação de ração animal. Contudo, como as esferas são constituídas de biopolímeros, logo são biodegradáveis, e podem ser destinadas para o setor da agroindústria como biofertilizantes, fornecendo nitrogênio e indutores de crescimento para as plantas, resultando em culturas com maior produtividade sem danos ambientais.

## 5. Exemplos

[053]. Um exemplo de realização da presente invenção direcionada para o tratamento de águas residuárias a partir de microalgas imobilizadas consiste nas etapas de:

- 1) seleção e adaptação da microalga as condições operacionais do sistema de pH, temperatura, intensidade luminosa e agitação por aeração de ar comprimido;
- 2) cultivo prévio da espécie em meio sintético CHU e posterior imobilização para o aprisionamento das células;
- 3) inserção das esferas geradas na etapa 2 no fotobiorreator juntamente com o meio de cultura líquido/efluente.
- 4) recuperação das esferas de microalgas cultivadas em efluente e destinação comercial.

[054]. Em um aspecto particular, a cultura estoque da microalga *Tetrademus obliquus* foi mantida e propagada em meio sintético CHU, nas condições de 22°C, aeração com vazão volumétrica de 1 L min<sup>-1</sup>, iluminação de 1 klux e pH ajustado para aproximadamente 7,0-8,0. O inoculo inicial foi cultivado por 15 dias em meio fotoautotrófico. A microalga foi monitorada a cada 24 horas a partir da contagem do número de células e determinação de biomassa seca pelo método gravimétrico, o que permitiu estabelecer a curva de crescimento

durante os ensaios.

[055]. O método de imobilização é utilizado após o cultivo prévio, onde 160 ml do volume do meio contendo as microalgas foi coletado para centrifugação e ressuspensão em um volume de 200 ml, e posteriormente misturado em uma solução estéril contendo 1 g de alginato de sódio. Tal mistura foi injetada em uma bureta para ser gotejada em uma solução contendo cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,4 M, sob agitação constante (200 rpm) com o auxílio de um agitador magnético para estabilizar os grânulos. As esferas foram formadas imediatamente e, logo após, revestidas com uma solução adicional de nanopartículas de quitosana. A quitosana foi modificada por meio da gelificação iônica com heptamolibdato de amônia; 5 g de quitosana foram dissolvidas em uma solução de 2% de ácido acético. As esferas foram banhadas com a solução sob agitação uniforme por 30 minutos de modo a fortalecer e estabilizar os grânulos. Após o tempo decorrido, as esferas foram brevemente inseridas em uma solução de heptamolibdato de amônia a  $2 \text{ g L}^{-1}$ , e logo lavadas para a remoção do excesso do composto. Finalmente, formaram-se as esferas com tamanho de aproximadamente 3 a 5 mm.

[056]. Em uma forma de realização da invenção, as esferas de microalgas imobilizadas são inoculadas no fotobiorreator da etapa 3, caracterizado pelo sistema híbrido (terra-água) ou pelo cartucho modular, equipamentos do presente invento.

[057]. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura compreende o efluente oriundo da suinocultura, rico em compostos nitrogenados e fosfatados.

[058]. Em uma modalidade da presente invenção, finalizada a etapa do tratamento do efluente, as esferas contendo microalgas imobilizadas são destinadas para usos na agricultura, como biofertilizantes. As esferas são enterradas na base das plantas, liberando gradativamente nutrientes e indutores, promovendo o crescimento e uma melhor produtividade dos cultivares.

[059]. A título de exemplificação, um evento real do presente invento pode ser descrito através da Figura 1, que representa a microalga *Tetrademus obliquus* imobilizada em alginato de sódio crescendo sob condições

fotoautotróficas em fotobiorreator experimental.

[060]. A descrição acima é apenas uma das modalidades de concretização da presente invenção e o seu escopo técnico não pode de forma alguma estar circunscrito à mesma. Quaisquer características particulares, bem como outras formas de realização nela introduzidas, incluindo alterações ou substituições, serão evidenciadas a partir de práticas e especificações do bioprocessamento aqui revelado. Pretende-se, portanto, que o exemplo descrito seja considerado meramente como objeto para facilitar a compreensão, tendo em vista que o real escopo da presente invenção é indicado pelas reivindicações.

## 6. Reivindicações

1) FOTOBIORREATOR DE MICROALGAS LIVRES E/OU IMOBILIZADAS **caracterizado por** possuir os seguintes componentes:

a) Materiais transparentes compreendendo vidro, polímeros reforçados ou não, a base de polietileno, poliestireno, polipropileno, policarbonato, PVC, PTFE, PET, PETG, poli ácido láctico e acrílico;

b) Instrumentação e controle de líquidos e gases através de válvula do tipo gaveta, globo, pistão, agulha, esfera, diafragma e/ou válvula de fundo;

c) Acessórios de bombeamento ou transferência de efluente compreenderem bombas centrífugas, de deslocamento positivo, axiais, heliocentrífugas e/ou volumétricas rotativas;

d) Modo de operação descontínua, semi-contínua, com ou sem reciclo de microalgas e/ou efluentes, em escala laboratorial, piloto e industrial;

e) Unidades e/ou subunidades para cultivo e armazenamento de microalgas livres e/ou imobilizadas, definidas como módulos, compreendendo geometrias retangulares, redondas e/ou cilíndricas.

2) FOTOBIORREATOR HÍBRIDO MODULAR, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** possuir os seguintes componentes adicionais aos componentes da reivindicação 1:

a) *Air-lift* ou leito fluidizado acoplado a módulos flutuantes ou terrestres, construídos em material plástico;

b) Módulos flutuantes constituídos de filme plástico selado e transparente,

dispensando suportes ou sistemas de sustentação;

c) Zona desgaseificadora (*degasser*) compreendendo tubos transparentes verticais para a alimentação e remoção de ar.

3) FOTOBIORREATOR BASEADO EM CARTUCHOS MODULARES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** possuir os seguintes componentes adicionais aos componentes da reivindicação 1:

a) Cartuchos compreendendo módulos de fotobiorreator do tipo leito fixo ou fluidizado, dispostos em serie ou paralelo, de fluxo ascendente ou descendente;

b) Malha de aço para retenção de microalgas imobilizadas dentro dos módulos;

c) Módulo constituído de uma coluna vertical de secção circular;

d) Válvula de amostragem para microalgas imobilizadas;

e) Escalonamento do reator em função do número e disposição dos cartuchos.

4) PROCESSO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES A PARTIR DE MICROALGAS LIVRES OU IMOBILIZADAS **caracterizado por** conter as seguintes etapas:

a) Cultivo de microalgas fotoautotrófico, fotoheterotrófico, heterotrófico e/ou mixotrófico, preferencialmente da microalga *Tetradismus obliquus* e dos seguintes gêneros: *Tetradismus* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Spirulina* sp., *Anabaena* sp., *Skeletonema* sp., *Chaetoceros* sp., *Anacystis* sp., *Euglena* sp., *Cryptocodinium* sp., *Haematococcus pluialis*, *Dunaliella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Rhodella*, *Tetraedrom*, *Trichodesmium*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc muscorum*, *Synechococcus*, *Botryococcus braunii*, bem como outros gêneros e espécies de microalgas e cianobactérias, combinações e/ou consórcios de espécies de microalgas e bactérias;

b) Imobilização de microalgas a partir de biomassa seca de microalgas, biomassa úmida e/ou cultivo de microalgas, com ou sem suporte, por técnicas de adsorção, auto-imobilização, imobilização na matriz ou encapsulamento,

utilizando polímeros e/ou biopolímeros, incluindo PHB, PHA, PHV, PHB-HV, carragena, alginato, quitosana, celulose e ágar, para formação e uso de esferas, microesferas, cápsulas e microcápsulas;

c) Tratamento de efluentes em fotobiorreator híbrido (terra-água) e/ou cartuchos modulares, como sistema de tratamento secundário e/ou terciário de águas residuárias agrícolas, industriais, domésticas e de processamento de aves, suínos e/ou peixe;

d) Colheita de microalgas livres ou imobilizadas obtidas após o tratamento de efluentes, caracterizadas como produto ou subproduto do processo.

5) USO DAS MICROALGAS LIVRES E/OU IMOBILIZADAS, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** aplicação em:

a) Rações animais, como biocombustíveis, biofertilizantes, cosméticos, alimentação humana e química fina;

b) Produtos de biorrefinaria de microalga, tais como proteínas, aminoácidos, óleos e ácidos graxos, carboidratos e exopolissacarídeos, pigmentos, minerais e ácidos nucleicos;

c) Modificação dos produtos ou subprodutos por técnicas de *spraydryer*, liofilização e cristalização.

## 2 Referências

- ABDEL-RAOUF N, AL-HOMAIDAN AA, IBRAHEEM IBM (2012). **Microalgae and wastewater treatment**. Saudi Journal of Biological Sciences 19:257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- ABDULLA R, KING TK, JAMBO SA, FAIK AA (2020) **Microalgae *Chlorella* as a sustainable feedstock for bioethanol production**. Green Engineering for Campus Sustainability. Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7260-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7260-5_7)
- ABOU-SHANAB RAI, JI MK, KIM HC, ET AL (2013) **Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production**. Journal of Environmental Management 115:257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>
- ACIÉN FG, MOLINA E, REIS A, ET AL (2017) **Photobioreactors for the production of microalgae**. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. In Woodhead Publishing Series in Energy. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
- AGUILAR-MAY B, SÁNCHEZ-SAAVEDRA MDP (2009) **Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus***. Journal of Applied Phycology 21:353–360. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9376-7>
- AL-ZUHAIR S, EL-NASS M (2011) **Immobilization of *Pseudomonas putida* in PVA gel particles for the biodegradation of phenol at high concentrations**. Biochemical Engineering Journal 56:46–50. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.005>
- ANA. Agência Nacional de Águas. **Atlas Esgotos revela mais de 110 mil km derios com comprometimento da qualidade da água por carga orgânica**. 2017. Disponível em < <https://www.ana.gov.br/noticias/atlas-esgotos-revela-mais-de-110-mil-km-de-rios-com-comprometimento-da-qualidade-da-agua-por-carga-organica>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2020.
- ANDREOLI CV, VON SPERLING M, FERNANDES F (2007) **Sludge treatment and disposal**. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402130>
- ANJANEYULU Y, SREEDHARA CHARY N, SAMUEL SUMAN RAJ D (2005) **Decolourization of industrial effluents - Available methods and emerging technologies - A review**. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 4:245–273. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-1246-z>
- ARBIB Z, RUIZ J, ÁLVAREZ-DÍAZ P, et al (2013) **Photobiotreatment: Influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus Obliquus***. International Journal of Phytoremediation 15:774–788. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.735291>
- ASSUNÇÃO J, MALCATA FX (2020) **Enclosed “non-conventional”**

**photobioreactors for microalga production: A review.** Algal Research 52. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102107>

BARTEN RJP, WIJFFELS RH, BARBOSA MJ (2020) **Bioprospecting and characterization of temperature tolerant microalgae from Bonaire.** Algal Research 50. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102008>

BAUER, L. M.; RODRIGUES, E.; RECH, R. **Potential of immobilized *Chlorella minutissima* for the production of biomass, proteins, carotenoids and fatty acids.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 25, n. January, p. 101601, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101601>>.

BOROWITZKA MA, BEARDALL J, RAVEN JA (2016) **The Physiology of Microalgae.** Developments in Applied Phycology. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>

CAO, S.; TENG, F.; WANG, T.; LI, X.; LV, J.; CAI, Z.; TAO, Y. **Characteristics of an immobilized microalgae membrane bioreactor (iMBR): Nutrient removal, microalgae growth, and membrane fouling under continuous operation.** Algal Research, v. 51, 102072, 2020.

CAPORGNO MP, TALEB A, OLKIEWICZ M, et al (2015) **Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane.** Algal Research 10:232–239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>

CAROLINA, L.; GONÇALVES, F. **Fosfatos e ferro : Utilização de *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de sódio.** , 2013.

CASTRO YA, ELLIS JT, MILLER CD, SIMS RC (2015) **Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation.** Applied Energy 140:14–19. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.045>

CHE CA, KIM SH, HONG HJ, et al (2019) **Optimization of light intensity and photoperiod for *Isochrysis galbana* culture to improve the biomass and lipid production using 14-L photobioreactors with mixed light emitting diodes (LEDs) wavelength under two-phase culture system.** Bioresource Technology 285:121323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121323>

CHEIRSILP B, THAWECHAI T, PRASERTSAN P (2017) **Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor.** Bioresource Technology 241:787–794. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.016>

CHOUDHARY P, PRAJAPATI SK, KUMAR P, et al (2017) **Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications.** Bioresource Technology 224:276–284.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.078>

CORRÊA DO, SANTOS B, DIAS FG, et al (2017) **Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel engine hazardous emissions fixation**. *International Journal of Hydrogen Energy* 42:21463–21475. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.176>

DANESHVAR E, SIK OK Y, TAVAKOLI S, et al (2021) **Insights into upstream processing of microalgae: A review**. *Bioresource Technology* 329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>

DA SILVA, P. A. S.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; SEVERO, I. A. **Phycoremediation: Role of Microalgae in Waste Management and Energy Production**. *Waste-to-Energy*. p.511–537, 2022. Cham: Springer International Publishing. Disponível em: <[https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-91570-4\\_17](https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-91570-4_17)>.

DE CORATO, U.; SALIMBENI, R.; DE PRETIS, A.; AVELLA, N.; PATRUNO, G. **Use of alginate for extending shelf life in a lyophilized yeast-based formulate in controlling green mould disease on citrus fruit under postharvest condition**. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 15, n. May 2017, p. 76–86, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.11.006>>.

DELL' ANNO F, RASTELLI E, SANSONE C, BRUNET C, IANORA A, DELL' ANNO A (2021) **Bacteria, Fungi and Microalgae for the Bioremediation of Marine Sediments Contaminated by Petroleum Hydrocarbons in the Omics Era**. *Microorganisms* 9, 1695. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>

DEPRÁ MC, DOS SANTOS AM, SEVERO IA, et al (2018) **Microalgal biorefineries for bioenergy production: can we move from concept to industrial reality?** *Bioenergy Research* 11:727–747. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9934-z>

DORAN PM (2013) **Bioprocess engineering principles**, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>

EMPARAN Q, HARUN R, DANQUAH MK (2019) **Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: A review**. *Applied Ecology and Environmental Research* 17:889–915. [https://doi.org/10.15666/aeer/1701\\_889915](https://doi.org/10.15666/aeer/1701_889915)

FILIPPINO KC, MULHOLLAND MR, BOTT CB (2015) **Phycoremediation strategies for rapid tertiary nutrient removal in a waste stream**. *Algal Research* 11:125–133. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.011>

FRANCISCO ÉC, NEVES DB, JACOB-LOPES E, FRANCO TT (2010)

- Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology 85:395–403. <https://doi.org/10.1002/jctb.2338>
- GALÈS A, TRIPLET S, GEOFFROY T, et al (2020) **Control of the pH for marine microalgae polycultures: A key point for CO<sub>2</sub> fixation improvement in intensive cultures.** Journal of CO<sub>2</sub> Utilization 38:187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.01.019>
- GAO F, YANG ZH, LI C, et al (2014) **Concentrated microalgae cultivation in treated sewage by membrane photobioreactor operated in batch flow mode.** Bioresource Technology 167:441–446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.042>
- GAO K, ORR V, REHMANN L (2016) **Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction.** Bioresource Technology 206:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.036>
- GEORGE B, PANCHA I, DESAI C, et al (2014) **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 171:367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>
- GIESE EC (2015) **Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio.** CETEM/MCTI.
- GOUVEIA L, OLIVEIRA AC (2009) **Microalgae as a raw material for biofuels production.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36:269–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495->
- GROBBELAAR JU (2007) **Algal nutrition - mineral nutrition.** Handbook of Microalgal Culture 95–115. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch6>
- GUISAN JM (2006) **Immobilization of Enzymes and Cells**, 2nd ed. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7>
- GUPTA SK, BUX F (2019) **Application of microalgae in wastewater treatment**, 1st edn. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13913-1>
- HAMEED MSA (2007) **Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal.** African Journal of Biotechnology 6:1185–1191
- HAN SF, JIN W, TU R, et al (2016) **Optimization of aeration for biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* grown in municipal wastewater.** Bioprocess and Biosystems Engineering 39:1073–1079. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1585-x>
- HENA S, ZNAD H, HEONG KT, JUDD S (2018) **Dairy farm wastewater**

**treatment and lipid accumulation by *Arthrospira platensis*.** Water Research 128:267–277. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.057>

HERNÁNDEZ D, RIAÑO B, COCA M, et al (2016) **Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications.** Chemical Engineering Journal 285:449–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.072>

HO SH, HUANG SW, CHEN CY, et al (2013a) **Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E.** Bioresource Technology 135:157–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>

HO SH, HUANG SW, CHEN CY, et al (2013b) **Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.** Bioresource Technology 135:191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>

HUANG G, WANG Y (2003) **Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge at different pH value.** Water Quality Research Journal of Canada 38:541–551. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2003.035>

HWANG JH, KABRA AN, KIM JR, JEON BH (2014) **Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent.** Energy 78:887–894. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.10.086>

JAMBO SA, ABDULLA R, MOHD AZHAR SH, et al (2016) **A review on third generation bioethanol feedstock.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 65:756–769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>

JIANG L, LUO S, FAN X, et al (2011) **Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>.** Applied Energy 88:3336–3341. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.043>

JIMÉNEZ-PÉREZ M V., SÁNCHEZ-CASTILLO P, ROMERA O, et al (2004) **Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure.** Enzyme and Microbial Technology 34:392–398. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.07.010>

KOBERG M, COHEN M, BEN-AMOTZ A, GEDANKEN A (2011) **Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation.** Bioresource Technology 102:4265–4269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.004>

KUBE, M.; FAN, L.; RODDICK, F. **Alginate-immobilized algal wastewater treatment enhanced by species selection.** Algal Research, v. 54, 102219, 2021.

KUBE M, MOHSENI A, FAN L, RODDICK F (2020) **Energy and nutrient recovery by treating wastewater with fluidised-beds of immobilised algae.**

Journal of Water Process Engineering 38:101585.  
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101585>

KUMAR G, SIVAGURUNATHAN P, THI NBD, et al (2016) **Evaluation of different pretreatments on organic matter solubilization and hydrogen fermentation of mixed microalgae consortia.** International Journal of Hydrogen Energy 41:21628–21640.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.195>

KUMAR R, MEHARIYA S, VERMA P, et al (2021) **Microalgae-based biorefineries for sustainable resource recovery from wastewater.** Journal of Water Process Engineering 40:101747.  
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101747>

LI K, LIU Q, FANG F, et al (2019) **Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review.** Bioresource Technology 291:121934.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121934>

LIMA U DE A, AQUARONE E, BORZANI W, SCHMIDELL W (2007) **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**, 2nd edn. São Paulo: E. Blücher

LU W, ASRAFUL ALAM M, LIU S, et al (2020) **Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: A review.** Science of the Total Environment 716:135247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247>

LUTZU GA, CIURLI A, CHIPELLINI C, et al (2021) **Latest developments in wastewater treatment and biopolymer production by microalgae.** Journal of Environmental Chemical Engineering 9:104926.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104926>

MALINOSKI, L.; MARANHO, L. T. **Imobilização de consórcio de bactérias extraídas da rizosfera de *echinocloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, e seu potencial para a degradação de petróleo.** Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 7, p. 50373–50395, 2020.

MALLICK N (2002) **Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review.** BioMetals 15:377–390.  
<https://doi.org/10.1023/A:1020238520948>

MANTZOROU A, VERVERIDIS F (2019) **Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques.** Science of the Total Environment 651:3187–3201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355>

MICHELS MHA, VASKOSKA M, VERMUË MH, WIJFFELS RH (2014) **Growth of *Tetraselmis suecica* in a tubular photobioreactor on wastewater from a fish farm.** Water Research 65:290–296.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.017>

MIN KJ, OH DY, PARK KY (2021) **Pilot-scale cultivation of water-net in secondary effluent using an open pond raceway for nutrient removal and**

**bioethanol production.** Chemosphere 277:130129.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130129>

MIYAWAKI B, MARIANO AB, VARGAS JVC, et al (2021) **Microalgae derived biomass and bioenergy production enhancement through biogas purification and wastewater treatment.** Renewable Energy 163:1153–1165.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.045>

MOHEIMANI NR, VADIVELLOO A, AYRE JM, PLUSKE JR (2018) **Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent.** Algal Research 35:362–369.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.007>

MOHSENPOUR SF, HENNIGE S, WILLOUGHBY N, et al (2021) **Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review.** Science of the Total Environment 752:142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>

MORENO-GARRIDO I (2008) **MICROALGAE IMMOBILIZATION: Current techniques and uses.** Bioresource Technology 99:3949–3964.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>

NGUYEN TTD, NGUYEN TT, AN BINH Q, et al (2020) **Co-culture of microalgae-activated sludge for wastewater treatment and biomass production: Exploring their role under different inoculation ratios.** Bioresource Technology 314:123754.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123754>

NWOBA EG, PARLEVLIT DA, LAIRD DW, et al (2019) **Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency.** Algal Research 39:101433. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101433>

PRAJAPATI SK, KAUSHIK P, MALIK A, VIJAY VK (2013) **Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges.** Biotechnology Advances 31:1408–1425.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.005>

RICHMOND A (2004) **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology.** Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. <http://doi.org/10.1002/9780470995280>

ROSSI S, CASAGLI F, MANTOVANI M, et al (2020) **Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater.** Bioresource Technology 305:122995.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122995>

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. **Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater.** Bioresource Technology, v. 101, n. 1, p. 58–64, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>>.

SAFARI, J.; AZIZI, F.; SADEGHI, M. **Chitosan nanoparticles as a green and renewable catalyst in the synthesis of 1,4-dihydropyridine under solvent-free conditions**. *New Journal of Chemistry*, v. 39, n. 3, p. 1905–1909, 2015b. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4NJ01730G>>.

SAJJADI B, CHEN WY, RAMAN AAA, IBRAHIM S (2018) **Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97:200–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>

SAMER M (2015) **Biological and Chemical Wastewater Treatment Processes, Wastewater Treatment Engineering**. IntechOpen, DOI: 10.5772/61250

SANTOS, B. **Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico**. UFPR, p. 104, 2016.

SARKAR P, DEY A (2021) **Phycoremediation – An emerging technique for dye abatement: An overview**. *Process Safety and Environmental Protection* 147:214–225. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.09.031>

SATYANARAYANA KG, MARIANO AB, VARGAS JVC (2011) **A review on microalgae , a versatile source for sustainable energy and materials**. *International Journal of Energy Research* 21. <https://doi.org/10.1002/er>

SCHMIDELL W, LIMA U DE A, AQUARONE E, BORZANI W (2001) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, 2nd edn. São Paulo: E. Blücher

SEVERO IA, DEPRÁ MC, BARIN JS, et al (2018) **Bio-combustion of petroleum coke: The process integration with photobioreactors**. *Chemical Engineering Science* 177:422–430. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.12.001>

SEVERO IA, DEPRÁ MC, DIAS RR, et al (2020) **Bio-combustion of petroleum coke: The process integration with photobioreactors**. Part II – Sustainability metrics and bioeconomy. *Chemical Engineering Science* 213:115412. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115412>

SEVERO IA, DIAS RR, SARTORI RB, MARONEZE MM, ZEPKA LQ, JACOB-LOPES E (2021) Chapter 4: **Technological Bottlenecks in Establishing Microalgal Biorefineries**. In: Shekh A, Schenk P, Sarada R (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Recent Advances, Market Potential, and Sustainability*, Royal Society of Chemistry, p. 118 - 134.

SHEN, Y.; GAO, J.; LI, L. **Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal**. *Bioresource Technology*, v. 243, p. 905–913, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>>

SHI J, PODOLA B, MELKONIAN M (2014) **Application of a prototype-scale twin-layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae.** *Bioresource Technology* 154:260–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.100>

SILVA, M. C. C. de P. **Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2011

SIVAKAMINATHAN S, HANKAMER B, WOLF J, YARNOLD J (2018) **High-throughput optimisation of light-driven microalgae biotechnologies.** *Scientific Reports* 8:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29954-x>

STRAKA L, RITTMANN BE (2018) **Light-dependent kinetic model for microalgae experiencing photoacclimation, photodamage, and photodamage repair.** *Algal Research* 31:232–238.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.022>

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E. M.; GALAN, M. A. **Microalgae Technology: A Patent Survey.** *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 2013.

TELLES EC, YANG S, VARGAS JVC, et al (2018) **A genset and mini-photobioreactor association for CO<sub>2</sub> capturing, enhanced microalgae growth and multigeneration.** *Renewable Energy* 125:985–994.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.027>

UNESCO. **Relatório Mundial das Nações Unidas Sobre Desenvolvimento dos Recursos Hídricos** 2017. p. 8, 2017.

VARGAS JVC, MARIANO AB, CORRÊA DO, ORDONEZ JC (2014) **The microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors.** *International Journal of Hydrogen Energy* 39:9588–9598.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.093>

VASILIEVA S, LOBAKOVA E, GRIGORIEV T, et al (2021) **Bio-inspired materials for nutrient biocapture from wastewater: Microalgal cells immobilized on chitosan-based carriers.** *Journal of Water Process Engineering* 40:101774. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101774>

VASILIEVA SG, LOBAKOVA ES, LUKYANOV AA, SOLOVCHENKO AE (2016) **Immobilized microalgae in biotechnology.** *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 71:170–176. <https://doi.org/10.3103/S0096392516030135>

VILLADSEN J, NIELSEN J, LIDÉN G (2011) **Bioreaction Engineering Principles**, Third Edit. Springer US. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>

VO HNP, NGO HH, GUO W, et al (2018) **A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment**. *Science of the Total Environment* 651:1549–1568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.282>

VIJAYALAKSHMI, K.; GOMATHI, T.; LATHA, S.; HAJEETH, T.; SUDHA, P. N. **Removal of copper(II) from aqueous solution using nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p. 440–452, 2016.

VON SPERLING M (2015) **Activated sludge and aerobic biofilm reactors**. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402123>

VON SPERLING M (2007a) **Wastewater characteristics, treatment and disposal**. IWA Publishing UFMG

VON SPERLING M (2007b) **Waste stabilisation ponds**. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402109>

WANG R, LI F, RUAN W, et al (2020) **Removal and degradation pathway analysis of 17 $\beta$ -estradiol from raw domestic wastewater using immobilised functional microalgae under repeated loading**. *Biochemical Engineering Journal* 161:107700. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107700>

WANG Y, HO SH, CHENG CL, et al (2016) **Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment**. *Bioresource Technology* 222:485–497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106>

WIPO. World Intellectual Property Organization, 2016. **Patent Landscape Report on Microalgae-Related Technologies**. Disponível em: <https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4042&plang=FR>. Acesso em: 04 de outubro de 21.

WITTMANN C, LIAO JC (2016) **Industrial Biotechnology: Products and Processes**. Wiley-VCH & Co.

YUAN S, HU J, LIU Z, et al (2020) **Modeling microalgae growth in continuous culture: Parameters analysis and temperature dependence**. *Energy* 195:116961. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.116961>

XIE, B.; GONG, W.; YU, H.; TANG, X.; YAN, Z.; LUO, X.; GAN, Z.; WANG, T.; LI, G.; LIANG, Z. Immobilized microalgae for anaerobic digestion effluent treatment in a photobioreactor-ultrafiltration system: Algal harvest and membrane fouling control. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 139-148, 2018.

ZHAO B, ZHANG Y, XIONG K, et al (2011) **Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO<sub>2</sub> fixation**. *Chemical Engineering Research and Design* 89:1758–1762. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.02.018>

ZHOU M, HE H, JIN T, WANG H (2012) **Power generation enhancement in**

**novel microbial carbon capture cells with immobilized *Chlorella vulgaris*.**  
Journal of Power Sources 214:216–219.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.04.043>