

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Crescimento de microalgas em efluente de
curtume: remoção de nutrientes,
viabilidade de produção de biodiesel e
utilização da biomassa residual**

TESE DE DOUTORADO

Juliana Tolfo da Fontoura

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Crescimento de microalgas em efluente de
curtume: remoção de nutrientes,
viabilidade de produção de biodiesel e
utilização da biomassa residual**

TESE DE DOUTORADO

Juliana Tolfo da Fontoura

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Área de concentração: Couro e biotecnologia

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Mariliz Gutterres

Co-orientador:
Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado intitulada *Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual*, elaborada por Juliana Tolfo da Fontoura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Clarisse Piatnicki

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Hickert Cruz

Prof^ª. Dr^ª Luciane Maria Colla

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a minha mãe que me guiaram e iluminaram meu caminho durante esta caminhada.

A minha família, pela confiança, amor e incentivo.

Agradeço imensamente a minha orientadora professora Mariliz Gutterres pela orientação, oportunidade de aprendizado e pelo exemplo de pessoa e dedicação a profissão.

Ao meu co-orientador Marcelo Farenzena por toda dedicação, ensinamentos, conselhos e incentivo.

Ao meu namorado, Uéslhei, por todo o carinho, amor e compreensão. Muito obrigada por me apoiar e me incentivar sempre.

Ao bolsista de iniciação científica Guilherme Rolim, pela amizade e por toda a dedicação e desempenho para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), pela convivência alegre e ajuda prestada durante todo período.

Aos pesquisadores do Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP), em especial a Nelzy Neyza Vargas Ramirez, por todo o apoio necessário para o início das atividades com microalgas.

A CIENTEC por me receber de portas abertas e ao professor Luiz Antonio Mazzini Fontoura pela paciência, pela partilha de conhecimento e pelos ensinamentos para a vida.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado e pela estrutura oferecida.

A UFRGS, a FINEP Edital CT Hidro 01/2013, a CAPES e ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e para o desenvolvimento desta tese, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

As microalgas são uma alternativa ecológica e economicamente viável para o tratamento de efluentes industriais, já que são capazes de assimilar compostos como nitrogênio, fósforo e carbono. Em consequência ao potencial para o tratamento de efluentes há a geração de biomassa que pode ser utilizada para a fabricação de produtos com valor agregado, como os biocombustíveis. Assim, neste trabalho, avaliou-se a viabilidade de crescimento e produção de biomassa microalgal em águas residuais de curtume, sem tratamento prévio e sem adição de nutrientes. Objetiva-se, com tais experimentos, verificar a capacidade de remoção de contaminantes deste efluente, bem como composição microalgal em proteínas, lipídios e carboidratos para subseqüente utilização. Inicialmente, verificou-se a influência da intensidade luminosa e da concentração do efluente de curtume na produção da biomassa da *Scenedesmus* sp., e na remoção de poluentes tais como nitrogênio amoniacal, fósforo e demanda química de oxigênio pela microalga. A microalga foi cultivada em efluente bruto de curtume sem tratamento prévio, coletado diretamente da etapa de ribeira, sob diferentes concentrações (entre 20% e 100%) e intensidade luminosa (entre 80 e 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com temperatura de 25 °C e aeração constante. Este estudo demonstrou que a concentração de efluente e a intensidade luminosa influenciaram positivamente na quantidade de biomassa produzida, bem como na remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo e DQO. Em um segundo passo, cultivaram-se as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. em fotobiorreatores airlift de 3 L, contendo diferentes concentrações de efluente bruto de ribeira de curtume (25%, 50% e 100%), sob intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, à temperatura ambiente (25 °C), durante 20 dias. Nos cultivos com a microalga *Scenedesmus* sp. foi observada máxima concentração de biomassa de 1,75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e elevadas remoções de nitrogênio total - NT (91,68%), nitrogênio amoniacal - $\text{NH}_3\text{-N}$ (94,36%), fósforo - $\text{PO}_4\text{-P}$ (97,33%), carbono inorgânico - CI (93,56%) e demanda química de oxigênio - DQO (66,64%). Elevados teores de lipídios (27,14%) e carboidratos (34,17%) também foram verificados. Os resultados obtidos a partir dos cultivos com a *Chlorella* sp. apresentaram máxima concentração de 1,64 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Além disso, foram observadas remoções de NT (91,59%), $\text{NH}_3\text{-N}$ (93,57%), $\text{PO}_4\text{-P}$ (98,10%), CI (89,46%), DQO (71,20%) e DBO (37,87%). Na composição da biomassa observou-se elevados teores de lipídios (25,46%) e carboidratos (36,36%). Na análise do perfil dos ácidos graxos, os biodiesel produzidos a partir dos lipídios das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. apresentaram estabilidade oxidativa, devido ao grau de saturação. Assim estes estudos demonstraram que o processo combinado de tratamento de efluentes na conversão de biomassa de microalgas oferece muitos méritos ambientais com a produção de produtos de valor agregado, como o biodiesel. Neste estudo também investigou-se a recuperação da biomassa utilizando agentes coagulantes/floculantes inorgânicos (cloreto férrico e sulfato de alumínio) e taninos vegetais orgânicos (Tanfloc SL, Tanfloc SG e Tanfloc SH). Além disso, também foram analisados os efeitos das condições operacionais sobre o teor de lipídios nas microalgas e na composição de ácidos graxos do biodiesel produzido a partir dos lipídios. Verificou-se elevada eficiência de recuperação de biomassa de aproximadamente 98% para as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. utilizando o tanino vegetal Tanfloc SH e ainda não foi observado alteração no conteúdo de ácidos graxos em FAEE com o uso do tanino floculante. A fim de maximizar a produção de energia obtida através das microalgas e reduzir os custos totais dos processos e do tratamento de resíduos, a biomassa residual gerada a partir da síntese do biodiesel foi utilizada como um adsorvente alternativo do corante Acid Blue 161 (AB-161) utilizado amplamente na indústria coureira. A biomassa foi caracterizada por técnicas analíticas de FTIR, MEV, BET, BJH e potencial zeta. As quantidades máximas de corante AB-161 adsorvido foram de 75,78 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a 25 °C e de 83,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a 40 °C. No tratamento de águas residuais de curtumes reais, os resultados mostram que a utilização da biomassa residual (após extração dos lipídios) como adsorvente, reduziu significativamente a concentração de corante (76,65%), carbono orgânico total - COT (50,78%) e nitrogênio total - TN (19,80%).

Abstract

Microalgae are an ecologically and economically viable alternative for the industrial wastewater treatment, since they are able to assimilate compounds such as nitrogen, phosphorus and carbon. As a consequence of the potential for the treatment of wastewater, there is the generation of biomass that can be used for the production of value-added products, such as biofuels. Thus, in this work, it was evaluated the viability of growth and production of microalgal biomass in tannery wastewater, without previous treatment and without addition of nutrients. The objective of these experiments was to verify the bioremediation capacity to remove contaminants from this effluent, as well as microalgal composition for subsequent use. The influence of light intensity and concentration of tannery effluent on *Scenedesmus* sp. biomass production, as well as the removal of pollutants such as ammoniacal nitrogen, phosphorus and chemical oxygen demand from the microalga were verified. The microalga was cultivated in raw wastewater from untreated tannery collected directly from the beamhouse stage under different concentrations (between 20% and 100%) and light intensity (between 80 and 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) with a temperature of 25°C and constant aeration. In a second step, the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. were grown in 3 L airlift photobiorators, containing different concentrations of raw tannery wastewater (25%, 50% and 100%), under light intensity of 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, at temperature (25°C) for 20 days. In the cultures with the *Scenedesmus* sp. microalgae, a maximum biomass concentration of 1.75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and high removals of total nitrogen (NT) (91.68%), $\text{NH}_3\text{-N}$ (94.36%), phosphorus - $\text{PO}_4\text{-P}$ (97,33%), inorganic carbon - CI (93,56%) and chemical oxygen demand - COD (66,64%). High levels of lipids (27.14%) and carbohydrates (34.17%) were also observed. The results obtained from the cultures with *Chlorella* sp. presented a maximum concentration of 1.64 g L^{-1} . In addition, NT (91.59%), $\text{NH}_3\text{-N}$ (93.57%), $\text{PO}_4\text{-P}$ (98.10%), CI (89.46%), COD (71.20%), and BOD (37.87%) removals were observed. The composition of the biomass showed high levels of lipids (25.46%) and carbohydrates (36.36%). In the analysis of the fatty acid profile, the ethylic biodiesel produced from the lipids of the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. presented oxidative stability due to the degree of saturation. Thus these studies have shown that the combined process of effluent treatment in the conversion of microalgae biomass offers many environmental merits with the production of value-added products, such as biodiesel. This study also investigated biomass recovery using inorganic coagulants / flocculants (ferric chloride and aluminum sulfate) and organic vegetable tannins (Tanfloc SL, Tanfloc SG and Tanfloc SH). In addition, the effects of operating conditions on lipid content in microalgae and on the fatty acid composition of biodiesel produced from lipids were also analyzed. There was a high biomass recovery efficiency of approximately 98% for the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. using Tanfloc SH and it was not observed any alteration in fatty acid content in FAEE with the use of flocculent tannin. In order to maximize energy production through microalgae and reduce the total costs of waste treatment processes and treatment, the residual biomass generated from the biodiesel synthesis was used as an alternative adder of the Acid Blue 161 dye (AB-161) widely used in the hull industry. Biomass was characterized by analytical techniques of FTIR, MEV, BET, BJH and zeta potential. The maximum amounts of adsorbed AB-161 dye were 75.78 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ at 25 °C and 83.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ at 40 °C. The results showed that the use of residual biomass (after lipid extraction) as adsorbent significantly reduced the concentration of dye (76.65%), total organic carbon (TOC) (50.78%) and total nitrogen - TN (19.80%).

Sumário

Introdução.....	1
1.1 Motivação.....	2
1.2 Objetivos do trabalho.....	4
1.3 Histórico da linha de pesquisa.....	5
1.4 Estrutura do trabalho.....	6
Revisão bibliográfica.....	9
2.1 Microalgas.....	9
2.1.1 Tipos de metabolismo.....	10
2.1.2 Formas de condução dos cultivos de microalgas.....	12
2.1.3 Sistemas para cultivos de microalgas.....	14
2.1.4 Fatores que influenciam a produção de biomassa.....	17
2.1.4.1 Temperatura.....	18
2.1.4.2 pH.....	19
2.1.4.3 Agitação do meio.....	19
2.1.4.4 Intensidade luminosa.....	20
2.1.4.5 Salinidade.....	21
2.1.4.6 Nutrientes.....	22
2.1.5 Métodos de recuperação da biomassa microalgal.....	25
2.1.6 Composição química das microalgas e bioprodutos.....	29
2.1.6.1 Proteína.....	29
2.1.6.2 Carboidrato.....	30
2.1.6.3 Lipídios	31
2.1.6.3.1 Biodiesel.....	32
2.1.6.3.2 Extração dos lipídios e potencialidade das microalgas para produção de biodiesel.....	35
2.1.6.4 Bioprodutos a partir da biomassa residual de microalgas.....	40
2.1.6.4.1 Processo de Adsorção com biossorvente.....	40
2.2 Tratamento de efluentes com microalgas interligado com a produção de biocombustíveis.....	42
2.3 Efluentes de curtumes.....	48
2.4 Processamento do couro.....	51+
Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae <i>Scenedesmus</i> sp.	56
3.1 Introduction.....	57
3.2 Materials and methods.....	60
3.2.1 Microalgae and culture medium.....	60
3.2.2 Raw tannery wastewater and characterization.....	60
3.2.3 Experimental setup and culture conditions.....	60
3.2.4 Determination of microalgae growth.....	60

3.2.5 Analysis of removal of contaminants.....	61
3.2.6 Experimental design.....	62
3.3 Results and discussion.....	62
3.3.1 Physicochemical characteristics of the wastewater tannery.....	62
3.3.2 Growth of <i>Scenedesmus</i> sp. in tannery wastewater by different cultivation conditions.....	63
3.3.3 Nutrient removal in tannery wastewater in different cultivation.....	66
3.4 Conclusion.....	71
3.5 Acknowledgements.....	72
3.6 References.....	72
Using tannery wastewater as source of nutrients for microalgae	
<i>Scenedesmus</i> sp.....	75
4.1 Introduction.....	76
4.2 Materials and Methods.....	78
4.2.1 Microalga and effluent of tannery.....	78
4.2.2 Experimental setup and culture conditions.....	78
4.2.3 Evaluation of biomass growth.....	79
4.2.4 Analysis of the removal of pollutants.....	79
4.2.5 Determination of microalgae composition.....	80
4.2.6 In-situ transesterification.....	81
4.2.7 Fatty acid composition analysis in GC.....	81
4.2.8 Statistical analysis.....	81
4.3 Results and Discussion.....	81
4.4 Conclusion.....	91
4.5 Acknowledgements.....	92
4.6 References.....	92
Simultaneous nutrient removal and lipid production from raw tannery wastewater by <i>Chlorella</i> sp.....	96
5.1 Introduction.....	97
5.2 Materials and methods.....	99
5.2.1 Microalgae and Effluent.....	99
5.2.2 Source of wastewater.....	99
5.2.3 Cultivation in photobioreactors.....	99
5.2.4 Analytical methods.....	100
5.2.5 Fatty acid analysis.....	102
5.3 Results and discussion.....	102
5.4 Conclusion.....	110
5.5 References.....	111
Biodiesel production chain evaluation based on treatment of tannery wastewater using microalgae – from nutrients removal to biodiesel quality.....	114
6.1 Introduction.....	115
6.2 Materials and Methods.....	117

6.2.1 Microalgae and tannery wastewater	117
6.2.2 Microalgal biomass recovery experiments	118
6.2.3 Determination of total lipids.....	119
6.3 Results and Discussion	119
6.3.1 Microalgae growth and tannery wastewater treatment.....	119
6.3.2 Assays for recovery of microalgae biomass.....	121
6.3.3 Analysis of lipid content.....	125
6.4 Conclusion.....	126
6.5 References.....	127
Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye from tannery effluent.....	129
7.1 Introduction.....	132
7.2 Materials and Methods.....	133
7.2.1 Solutions and reagents.....	133
7.2.2 Adsorbents preparation and characterization.....	134
7.2.3 Adsorption studies.....	135
7.2.4 Adsorption in Tannery Effluent.....	137
7.3 Results and Discussion.....	138
7.3.1. Characterization of the biosorbent.....	138
7.3.2 Effects of pH.....	141
7.3.3 Effects of biosorbent dosage.....	143
7.3.4 Kinetic studies.....	144
7.3.5 Equilibrium studies.....	145
7.3.6 Thermodynamic studies.....	147
7.3.7 Treatment of Tannery Effluent.....	148
7.4 Conclusion.....	149
7.5 Acknowledgments.....	149
7.6 References.....	149
Conclusões e Sugestões para trabalhos Futuros.....	154
8.1 Conclusões.....	154
8.2 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	157
Referências bibliográficas.....	158
Anexo A.....	180
Anexo B.....	182

Lista de Figuras

Figura 2.1: Curva de crescimento típica de microalgas em cultivo em batelada, com as etapas de crescimento identificadas. 1. Fase de adaptação ou Fase lag; 2. Fase exponencial ou Fase log; 3. Fase de redução do crescimento relativo ou de transição; 4. Fase estacionária; 5. Fase de declínio ou de morte.....	13
Figura 2.2: Exemplos de sistemas abertos para produção de microalgas. (a) sistemas tipo raceways de cultivo de <i>Nannochloropsis</i> sp. no Japão, (b) produção de <i>Dunaleilla salina</i> em lagoa abertas na Austrália e (c) lagoa circular para a produção de <i>Chlorella</i> em Taiwan.....	15
Figura 2.3: Fotobiorreator tubular em operação.....	17
Figura 2.4: Reação de transesterificação de triglicerídeo.....	37
Figura 2.5: Fluxograma do processamento do couro.....	52
Figure 3.1: Biomass growth curves for <i>Scenedesmus</i> sp. over time for the assays: (a) tannery wastewater concentration of 31.6% and 88.4% and light intensity of 97.5 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 182.5 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, (b) tannery wastewater concentration of 20%, 60% and 100% and light intensity of 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 140 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, (c) tannery wastewater concentration of 60% and light intensity of 140 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (triplicate).....	65
Figure 3.2: Response surface to influence of tannery wastewater concentration (%) and light intensity ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) on (a) Biomass (g.L^{-1}), (b) N-NH ₃ removal (%), (c) P-PO ₄ removal (%) and (d) COD removal (%).....	70
Figure 4.1: Biomass growth curves for <i>Scenedesmus</i> sp. over time, for culture conditions with dilutions of 25% (TW25%), 50% (TW50%) and 100% (TW100%) of tannery wastewater and control.....	82
Figure 4.2: Variation of pH in the different conditions of tannery wastewater with the culture time.....	83
Figure 4.3: Concentrations of (a) Total Nitrogen (TN), (b) Ammonia Nitrogen (NH ₃ -N), (c) Phosphorus (PO ₄ -P) and (d) Inorganic Carbon (IC) in the different culture conditions of microalgae <i>Scenedesmus</i> sp., over time.....	86
Figure 4.4: Initial (before treatment) and final (after treatment) concentrations of chemical oxygen demand (COD) in the different culture conditions of <i>scenedesmus</i> sp.....	86
Figure 4.5: Initial (before treatment) and final (after treatment) concentrations of biological oxygen demand (BOD) in the different culture conditions of <i>Scenedesmus</i>	87

sp.....	
Figure 5.1: Growth curves of <i>Chlorella</i> sp. in raw tannery wastewater under the dilutions of 1:3 (25% tannery wastewater and 75% water), 1:1 (50% tannery wastewater and 50% water), 1:0 (100% tannery wastewater and 0% water) and control (cultivated in the TAP medium).....	103
Figure 5.2: Initial and final concentrations of (a) total nitrogen (TN), (b) ammoniacal nitrogen (NH ₃ -N), (c) phosphorus (PO ₄ -P) and (d) inorganic carbon (IC) for the growing of <i>Chlorella</i> sp. in 100% tannery wastewater (1:0) and diluted 1:3 and 1:1....	105
Figure 5.3: Initial and final concentrations of (a) biochemical oxygen demand (BOD) and (b) chemical oxygen demand (COD) for the growing of <i>Chlorella</i> sp. in 100% tannery wastewater (1:0) and diluted 1:3 and 1:1.....	105
Figure 5.4: Maximum biomass concentration and lipid, carbohydrate, protein productivity under different growing conditions 1:3 (25% tannery wastewater and 75% water), 1:1 (50% tannery wastewater and 50% water), 1:0 (100% tannery wastewater and 0% water) and control (cultivated in the TAP medium).....	108
Figure 6.1: Growth curves of microalgae <i>Chlorella</i> sp. and <i>Scenedesmus</i> sp. in tannery wastewater without previous treatment.....	120
Figure 6.2: Initial and final (after treatment) concentrations of (a) total nitrogen (TN), (b) ammoniacal nitrogen (NH ₃ -N), (c) phosphorus (PO ₄ -P) and (d) chemical oxygen demand (COD).....	121
Figure 7.1: Chemical structure of the Acid Blue 161.....	134
Figure 7.2: Spectrum FTIR of the biosorbent DMB before and after the adsorption of AB-161 dye.....	138
Figure 7.3: SEM Micrographs of biosorbent DMB (a) before biosorption 3000x and (b) after biosorption 3000x.....	139
Figure 7.4: Optical microscopy micrographs of biosorbent DMB (a) before 2x (b) after 2x (c) before 20x and (d) after 20x dye sorption.....	140
Figure 7.5: (a) Nitrogen adsorption–desorption isotherms and (b) pore size distribution for the DMB.....	141
Figure 7.6: Effects of pH in the AB-161 dye removal and in amount of dye adsorbed by the DMB.....	142
Figure 7.7: Zeta potential of biosorbent DMB as a function of pH.....	143
Figure 7.8: Effects of biosorbent dosage in the AB-161 dye removal and in amount of dye adsorbed by the DMB.....	143

Figure 7.9: Kinetic models of adsorption of (a) AB-161 dye at 200.0 mg.L ⁻¹ and (b) AB-161 dye at 400.0 mg.L ⁻¹ on DMB. Conditions: initial pH, 4.0; temperature, 25 °C; adsorbent mass, 0.03 g.....	145
Figure 7.10: Adsorption isotherms of AB-161 from DMB in aqueous solution at (a) 25 °C and (b) 40 °C temperature. Conditions: initial pH, 4.0; temperature, 25 °C; adsorbent mass, 0.03 g.....	146
Figure 7.11: UV–vis spectra of tannery effluent before and after adsorption with DMB.....	148

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Classificação do biodiesel de acordo com as diferentes fontes de óleos utilizados como matéria-prima para a produção.....	33
Tabela 2.2: Comparação do teor de óleo, produtividade de óleo, área de produção e produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais com a microalga.....	34
Tabela 2.3: Propriedades do biodiesel de 1 ^a geração, biodiesel a partir de microalgas e limites dos padrões estabelecidos ANP, EN 14214 e ASTM D6751.....	38
Tabela 2.4: Remoção de nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, fósforo, DBO e DQO nos cultivos de microalgas em diferentes tipos de efluentes.....	45
Tabela 2.5: Biomassa produzida e conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas cultivadas em efluentes.....	47
Tabela 2.6: Características físico-químicas de águas residuais de curtumes.....	49
Table 3.1: Real and codified values of the variables used in the 2 ² central composite design.....	62
Table 3.2: Physicochemical characteristics of the beamhouse tannery wastewater.....	63
Table 3.3: Growth parameters of <i>Scenedesmus</i> sp. in the Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity.....	65
Table 3.4: Initial (IC) and final concentration (FC) and removal efficiency (%) of ammoniacal nitrogen (N-NH ₃), phosphorus (P-PO ₄) and chemical oxygen demand (COD) in the Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity.....	68
Table 3.5: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response biomass.....	70
Table 3.6: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response ammoniacal nitrogen removal (N-NH ₃).....	71
Table 3.7: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response	71

phosphorus removal (P-PO ₄).....	
Table 3.8: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response chemical oxygen demand (COD).....	71
Table 4.1: Parameters of microalgae growth in tannery wastewater and control medium biomass concentration (X), specific growth rate (μ), average productivity (P_{aver}), maximum productivity (P_{max}).....	83
Table 4.2: Removal efficiency (RE), removal rate (RR) and substrate conversion factor in biomass (Y) of nutrients uptake by microalgae in the different growing conditions.....	87
Table 4.3: Composition of the microalgal biomass.....	88
Table 4.4: Productivity in carbohydrates, proteins and lipids of the microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. in the different culture conditions.....	90
Table 4.5: Dominant fatty acids (% of total fatty acid) composition of biodiesel of the <i>Scenedesmus</i> sp. cultivated in the tannery wastewater in the conditions TW25%, TW50%, TW100% and control and of biodiesel of soy, tallow and palm.....	91
Table 5.1: Removal efficiency (RE) and removal rate (RR) of nutrients uptake by microalgae in the different growing conditions.....	106
Table 5.2: Composition of the microalgal biomass.....	108
Table 5.3: Profile of the fatty acid ethyl esters (%) obtained from the microalgae <i>Chlorella</i> sp. cultivated at 1:3, 1:1, 1:0 effluent dilutions and in the control condition (TAP medium).....	110
Table 6.1: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Chlorella</i> sp. using different flocculants in the proportion of 250 mg/g microalgae.....	122
Table 6.2: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Chlorella</i> sp. using different dosages of the flocculating tannin.....	123
Table 6.3: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Chlorella</i> sp. under dosages of 450 and 200 mg flocculant/g biomass of the flocculating tannin C respectively, varying the pH and Stirring speed in the flocculation step.....	124
Table 6.4: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Chlorella</i> sp. under dosages of 450 and 200 mg flocculant/g biomass of the flocculating tannin C respectively, varying the flocculation time and the	125

sedimentation time.....	
Table 6.5: Dominant fatty acids composition of lipid accumulated by <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Chlorella</i> sp. in nature and flocculated with flocculating tannin C.....	126
Table 7.1: Physical and chemical properties of the adsorbent.....	141
Table 7.2: Kinetic parameters for the adsorption of AB-161 from DMB.....	145
Table 7.3: Isotherm parameters for the adsorption of AB-161 from DMB.....	147
Table 7.4: Thermodynamic parameters for the adsorption of AB-161 with DMB.....	148
Table 7.5: Characterization of tannery effluent before and after adsorption with DMB.....	149

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Abreviaturas*

NT/TN	Nitrogênio Total/ <i>Total nitrogen</i>
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
NH ₃ .N	Nitrogênio amoniacal/ <i>Ammoniacal nitrogen</i>
PO ₄ -P	Fósforo/ <i>Phosphorus</i>
DQO/COD	Demanda Química de Oxigênio/ <i>Chemical Oxygen Demand</i>
DBO/BOD	Demanda bioquímica de oxigênio/ <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
DCC/CCD	Delineamento Composto Central/ <i>Central Composite Design</i>
CI/IC	Carbono inorgânico/ <i>Inorganic carbon</i>
TW25%	Cultivo de microalga na diluição de 25% de efluente/ <i>Cultivation of microalgae in the dilution of 25% wastewater</i>
TW50%	Cultivo de microalga na diluição de 50% de efluente/ <i>Cultivation of microalgae in the dilution of 50% wastewater</i>
TW100%	Cultivo de microalga no efluente sem diluição/ <i>Cultivation of microalgae in wastewater without dilution</i>
FAEE	Ésteres etílicos de ácidos graxos/ <i>Fatty acid ethyl esters</i>
Sc	<i>Scenedesmus</i> sp.
Chl	<i>Chlorella</i> sp.

*Português/*Inglês*

Símbolos*

X	Concentração de biomassa/ <i>Biomass concentration</i>	g.L ⁻¹
OD	Densidade ótica/ <i>Optical density</i>	-
P _x	Produtividade de biomassa/ <i>Biomass productivity</i>	g.L ⁻¹ .d ⁻¹
P _{aver}	Produtividade média de biomassa/ <i>Average productivity</i>	g.L ⁻¹ .d ⁻¹
P _{max}	Produtividade máxima de biomassa/ <i>Maximum productivity</i>	g.L ⁻¹ .d ⁻¹
μ	Taxa específica de crescimento/ <i>Specific growth rate</i>	d ⁻¹
RE	Remoção de nutrientes/ <i>Nutrient removal</i>	%
RR	Taxa de remoção/ <i>Removal rates</i>	mg.L ⁻¹ .d ⁻¹
Y	Fator de conversão do substrato em biomassa/ <i>Substrate conversion factor in biomass</i>	-
S ₀	Concentração inicial de nutrientes/ <i>Initial concentration of nutrients</i>	mg.L ⁻¹

S_i	Concentração de nutrientes no tempo t_i / <i>Nutrient concentration at time t_i</i>	mg.L^{-1}
N	Teor de nitrogênio/ <i>Nitrogen content</i>	%
$P_{(C)}$	Produtividade de carboidratos/ <i>Carbohydrate productivity</i>	$\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$
$P_{(P)}$	Produtividade de proteínas/ <i>Protein productivity</i>	$\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$
$P_{(L)}$	Produtividade de lipídios/ <i>Lipids productivity</i>	$\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$
X_f	Concentração final de biomassa/ <i>final biomass concentration</i>	mg.L^{-1}
$C_{(C)}$	Concentração de carboidratos/ <i>Carbohydrate concentration</i>	mg.L^{-1}
$C_{(P)}$	Concentração de proteínas/ <i>Protein concentration</i>	mg.L^{-1}
$C_{(L)}$	Concentração de lipídios/ <i>Lipids concentration</i>	mg.L^{-1}
t_f	Tempo final de cultura/ <i>Final culture time</i>	d^{-1}
Re	Eficiência da recuperação da biomassa/ <i>Recovery efficiency biomass</i>	%
OD_i	Absorbância (570 nm) antes da adição do floculante/ <i>Absorbance (570 nm) before addition of the flocculant</i>	-
OD_f	Absorbância (570 nm) após sedimentação/ <i>Absorbance (570 nm) after sedimentation</i>	-

*Português/*Inglês*

Capítulo 1

Introdução

O uso de microalgas no tratamento de efluentes industriais tem despertado grande interesse nas últimas décadas, devido à sua alta capacidade em absorver nutrientes orgânicos e inorgânicos, além de produzir uma biomassa valiosa devido à procura de fontes energéticas renováveis e de alta produtividade.

Tais microrganismos utilizam espécies químicas como nutrientes para as atividades metabólicas e síntese de biomassa. As células de microalgas armazenam nitrogênio, fósforo e carbono para a síntese de proteínas, lipídios, carboidratos, adenosina trifosfato (ATP) e outras formas biomoleculares (ZENG *et al.*, 2015). Devido à sua composição macromolecular, vários produtos comerciais podem ser alcançados a partir da biomassa de microalgas, como ração animal, fertilizantes ou na produção de produtos de química fina, tais como pigmentos, polissacarídeos, carotenos, esteróis, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados e lipídios. Além disso, as microalgas podem fornecer matéria-prima para diferentes tipos de combustíveis renováveis como o biodiesel, o metano, o etanol, entre outros (BAUMGARTNER *et al.*, 2013, CHEN *et al.*, 2011). As microalgas têm aplicação potencial para ser utilizadas como alternativa no tratamento de efluentes para a redução de matéria orgânica, DQO, DBO e eliminação de nutrientes tais como nitrogênio e fósforo, bem como na desinfecção (remoção de coliformes) e na remoção de metais pesados (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

A viabilidade das microalgas para o tratamento de efluentes industriais e obtenção de biomassa para a produção de biocombustíveis tem sido estudada por diversos autores

(ZHANG *et al.*, 2014; ZHAO, 2014; JIA *et al.*, 2016; MOLINUEVO-SALCES *et al.*, 2016; FAROOQ *et al.* 2013; KAMYAB *et al.* 2016).

A busca por fontes renováveis para a produção de biocombustíveis cresce a cada dia em nossa sociedade principalmente devido a problemas ambientais, como as emissões de gases oriundos da queima de combustíveis fósseis, que poderão acarretar em mudanças climáticas a nível global, bem como a previsão de durabilidade das reservas de combustíveis fósseis que não deve ultrapassar mais do que cinco décadas (SILVA *et al.*, 2011; HO *et al.*, 2012).

Nesse contexto, os biocombustíveis a partir de microalgas são uma alternativa atrativa devido à sua alta taxa de crescimento, elevados teores de lipídios, pouca ocupação territorial em comparação com as demais fontes de biocombustíveis, elevada absorção de CO₂, além da sua capacidade de se adaptar e crescer em diferentes ambientes (JORQUERA *et al.*, 2010; SINGH e OLSEN, 2011). A relação entre microalgas e biocombustíveis tem uma previsão promissora. Entretanto, uma tecnologia totalmente competitiva para essa produção ainda não deve estar totalmente disponível até 2020, pois, alguns aspectos importantes como aumento da produtividade (implantação, nutrientes e água) requerem o desenvolvimento de novas estratégias (MALCATA *et al.*, 2011). A produção de biomassa microalgácea para biocombustíveis é uma alternativa promissora, e a utilização de águas residuais é uma estratégia para a redução de custos dos combustíveis de microalgas, pois os nutrientes e a água doce contribuem com cerca de 50% do custo total de produção de biomassa (SING e DAS, 2014).

1.1 Motivação

A indústria do couro é uma importante atividade econômica em muitos países cuja economia é dependente da agropecuária. Até outubro de 2017, o Brasil já exportou neste ano 135 milhões de m² de couro bovino (salgado, wet-blue, crust e acabado). Do total de exportações, 67 milhões de m² (49,4%) foram de couro acabado, que possui maior valor agregado. O Brasil exporta para aproximadamente 90 países, dos quais se destacam a China (33%) e a Itália (21,2%) como os principais países compradores do produto nacional. Esses dados apontam que o couro brasileiro possui excelente

qualidade, o que acentua o destaque do Brasil no cenário da produção coureira mundial (ABQTIC, 2017).

O Brasil possui cerca de 220 curtumes, sendo que aproximadamente 80% se localizam nas regiões sul e sudeste. O Rio Grande do Sul lidera o ranking dos estados que mais comercializam couro junto ao mercado externo, respondendo por 21,1% das exportações. São Paulo está em segundo lugar, com 20,9%, e Goiás em terceiro, com 15,0% (GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2017).

O processamento do couro consiste em transformar a pele verde ou salgada em couro acabado através de uma série de operações e tratamentos químicos e mecânicos, que envolvem principalmente quatro componentes principais: pele, água, produtos químicos e energia.

As operações químicas são realizadas em meios aquosos, onde são adicionados produtos químicos tais como sais, surfactantes, ácidos, corantes, agentes curtentes, taninos naturais e sintéticos, óleos sulfonados, etc., durante as diversas etapas do processo. Os efluentes da indústria coureira são caracterizados por conter grande quantidade de material putrescível (proteínas, sangue e fibras musculares), elevadas demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), altas concentrações de impurezas inorgânicas (sais amoniacais, sulfetos e cloretos), sólidos suspensos e dissolvidos e outros poluentes específicos, por exemplo, taninos vegetais e/ou sintéticos, óleos sulfonados, cromo, e surfactantes (GUTTERRES *et al.*, 2015).

Considerando a grande quantidade e a baixa biodegradabilidade dos produtos químicos utilizados, o tratamento do efluente de curtume representa um relevante problema ambiental e tecnológico.

De um modo geral, os efluentes tratados em curtumes apresentam as seguintes configurações em suas estações de tratamento de efluentes: tratamento preliminar, tratamento primário ou físico químico e tratamento secundário ou biológico, em alguns casos emprega-se também o tratamento terciário ou de polimento.

Os processos físico-químicos envolvem a adição de agentes coagulantes e floculantes que podem causar impactos devido à toxicidade de algumas das espécies químicas usadas, podendo, mesmo em baixas concentrações, romper o equilíbrio do meio ambiente em relação à biota do corpo receptor (SEKI *et al.*, 2010).

Uma desvantagem do tratamento biológico é a geração de NO_x, que contribui para a poluição atmosférica (BEUCKELS *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2016). Além disto, as tecnologias tradicionais para o tratamento de efluentes produzem grandes quantidades

de resíduos sólidos, os lodos de decantadores, que podem conter compostos tóxicos cuja disposição final é geralmente gerida por custosos aterros industriais.

Assim a busca por estratégias que visam o desenvolvimento de processos eficientes, sustentáveis e de custos reduzidos torna-se essencial. Uma alternativa idealizada seria uma combinação entre o tratamento de águas residuais e a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, agregando valor ao processo final (QUEIROZ *et al.*, 2011).

1.2 Objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo estudar e avaliar a utilização de efluente bruto de curtume gerado em etapas de ribeira, sem prévio tratamento e sem adição de nutrientes como uma fonte alternativa de nutrientes para a produção de biomassa de microalgas, aliando o processo de tratamento de efluentes com vistas à produção de biocombustíveis. Outro propósito deste trabalho foi investigar a aplicação da biomassa residual após extração de lipídios (biomassa de microalgas desengordurada – DMB) como biossorvente de corantes da indústria coureira.

Para alcançar o objetivo descrito, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Avaliar a influência da intensidade luminosa e da concentração de efluente de curtume na produção de biomassa microalgal bem como na remoção de contaminantes tais como nitrogênio, fósforo e demanda química de oxigênio (DQO).
- Avaliar o potencial de cultivo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. em efluente de curtume bruto verificando a remoção de contaminantes bem como a composição microalgal.
- Produzir biodiesel por transesterificação a partir da biomassa das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em efluente de curtume bruto avaliando os perfis de ácidos graxos obtidos.
- Verificar a utilização de coagulantes/floculantes para recuperação da biomassa microalgal.

- Determinar a influência do uso de coagulantes/floculantes na composição dos ácidos graxos das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em efluente de curtume.
- Avaliar a utilização da biomassa residual (DMB) como bioissorvente do corante Acid Blue 161, amplamente utilizado na indústria coureira.
- Realizar a caracterização do bioissorvente DMB.
- Avaliar o desempenho cinético, as isotermas de adsorção e os parâmetros termodinâmicos que controlam a adsorção do corante Acid Blue 161 pelo bioissorvente DMB.

1.3 Histórico da linha de pesquisa

O LACOURO é um grupo atuante no setor coureiro, desenvolvendo pesquisas que englobam a otimização do processo industrial, o tratamento de resíduos e a minimização do impacto ambiental, ou seja, tem uma forte linha de pesquisa relacionada às questões ambientais. O grupo tem firmado sua posição como núcleo de pesquisa em couros do Brasil, o que lhe concede um reconhecimento nacional e internacional. O LACOURO tem uma forte linha de pesquisa relacionada com a biotecnologia e questões ambientais da indústria do couro. Este trabalho, realizado em parceria com o Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS, é primeiro dentro do Grupo LACOURO a estudar o tema microalgas no tratamento de efluentes de curtume e produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas. Diversos trabalhos prévios realizados pelo LACOURO e pelo GIMSCOP forneceram fundamentos teóricos à pesquisa.

O trabalho pioneiro no contexto da aplicação de processos biotecnológicos para a produção mais limpa, realizados no LACOURO, foi o produzido por Dettmer (2012). Neste estudo a autora realizou a seleção e o isolamento de bactérias produtoras de novas enzimas com possibilidade de utilização no processamento de couros na etapa de depilação/caleiro, com a finalidade de substituir o uso de produtos químicos agressivos ao meio ambiente. Dando seguimento a esta linha de pesquisa Andrioli (2012) estudou a aplicação associada de enzimas, produzidas por linhagens de *Bacillus subtilis* (isoladas por Dettmer (2012)) e peróxido de hidrogênio. A viabilidade da aplicação de metabolitos secundários produzidos por diferentes espécies de fungos como produtos

utilizados no processamento couro como corantes (FUCK, 2014) e biocidas (FONTOURA, 2013) também foi estudada.

Quanto à caracterização e tratamento de efluentes salienta-se os trabalhos de Baur (2012) que analisou as contaminações por nitrogênio de banhos residuais de ribeira, curtimento e acabamento molhado; Mella (2013) que avaliou a remoção de Cr(III) de banhos residuais de curtimento através das técnicas de precipitação química e eletrocoagulação e Gutterres *et al.* (2015) que descreveu as principais operações unitárias aplicadas no tratamento de efluente bem como a caracterização de efluentes de curtume do estado do Rio Grande do Sul. Outro trabalho importante nesta área relacionado com as tecnologias limpas foi o realizado por Aquim (2009) com o propósito de diminuir impacto ambiental causado nas águas pelos curtumes propondo o uso integrado e eficiente da água.

No tema de tratamento de corantes utilizados na indústria coureira por processos de adsorção, destacam-se os estudos realizados por Piccin (2013), Gomes (2014) e Mella (2017), onde foi avaliado o tratamento de corantes e efluentes de tingimento utilizando resíduos de curtume, como farelo de couro curtido ao cromo e de curtimento vegetal e pelos residuais do processo de depilação e caleiro, como adsorvente alternativo. Na linha de pesquisa de tratamento de corantes por processos biotecnológicos Ortiz-Monsalve (2015), verificou a pontencial aplicação de espécies nativas de fungos da podridão branca na descoloração de corantes para couro.

Com relação ao tratamento biológico dos resíduos sólidos destaca-se o trabalho de Agustini (2014) que teve por objetivo identificar os microrganismos que apresentam potencial de produzir biogás com alto teor de metano a partir de ensaios de biodegradação de lodo proveniente de aterros de curtume com farelo de couro.

Os trabalhos realizados pelo GIMSCOP imprescindíveis para a realização deste estudo, foram os produzidos por Ramirez, (2013) onde a autora avaliou a viabilidade de produzir a microalga *Scenedesmus* sp. usando a vinhaça como meio de cultivo e por Gris, (2011) que visou a otimização da produção da microalga *Nannochloropsis oculata* e aprimoramento de tecnologias visando o processamento adequado da biomassa gerada.

1.4 Estrutura do trabalho

O presente trabalho está estruturado em oito capítulos, conforme segue:

No **Capítulo 2** é apresentada uma revisão bibliográfica referente aos conceitos aplicados neste trabalho. Primeiramente será apresentado um breve descritivo acerca das microalgas e as diferentes aplicações da biomassa microalgal. Também será relatada a evolução no cenário dos biocombustíveis, destacando a inserção da biomassa de microalgas como matéria-prima para a produção do biodiesel. Em seguida, será abordada a potencial viabilidade da utilização de microalgas no tratamento de efluentes industriais e uma breve base teórica sobre a indústria do couro bem como a constituição da pele, etapas do processamento, características das águas residuais de curtume e tratamentos de efluentes aplicados.

Os materiais e métodos, bem como os resultados e discussão serão apresentados nos respectivos artigos escritos como resultado deste trabalho de doutorado.

No **Capítulo 3** é apresentado o primeiro artigo gerado por este trabalho, publicado no *Journal Process Safety and Environmental Protection* (PSEP), intitulado: “*Using tannery wastewater as source of nutrients for microalgae Scenedesmus sp.*”.

No **Capítulo 4** é apresentado o segundo artigo gerado por este trabalho, submetido para o *Biochemical Engineering Journal* (BEJ), intitulado: “*Treatment of beamhouse tannery wastewater with microalgae Scenedesmus sp. coupling to biodiesel production*”.

No **Capítulo 5** é apresentado o terceiro artigo gerado por este trabalho, submetido para o *Clean Technologies and Environmental Policy* (CTEP), intitulado: “*Simultaneous nutrient removal and lipid production from raw tannery wastewater by Chlorella sp.*”.

No **Capítulo 6** é apresentado o quarto artigo gerado por este trabalho, submetido para o *International Journal of Environmental Science and Technology* (JEST), intitulado: “*Biodiesel production chain evaluation based on treatment of tannery wastewater using microalgae – from nutrients removal to biodiesel quality*”.

No **Capítulo 7** é apresentado o quinto artigo gerado por este trabalho, publicado no periódico: *Journal of Environmental Chemical Engineering* (JECE), intitulado: “*Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye from tannery effluent*”.

No **Capítulo 8** são apresentadas as principais conclusões oriundas deste trabalho bem como as sugestões para trabalhos futuros, considerando os objetivos iniciais propostos.

O **Anexo A** apresenta os demais trabalhos originados como resultado da tese de doutorado, incluindo artigo publicado em revista e participação em congressos nacionais e internacionais. Já no **Anexo B** são descritos os procedimentos experimentais utilizados para a elaboração desta Tese.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

Neste capítulo é apresentada a revisão bibliográfica referente aos conceitos aplicados neste trabalho. Primeiramente será apresentada uma abordagem geral sobre as microalgas e as diferentes aplicações da biomassa microalgal. Também será descrita a evolução no cenário dos biocombustíveis, destacando a inserção da biomassa de microalgas como matéria prima para a produção do biodiesel. Em seguida, será abordado a potencial viabilidade da utilização de microalgas no tratamento de efluentes industriais e uma breve base teórica sobre as características das águas residuais de curtume e tratamentos de efluentes aplicados, bem como as etapas do processamento do couro.

2.1 Microalgas

As microalgas são reconhecidas como uma das mais antigas formas de vida e mantêm direta ou indiretamente praticamente toda a vida aquática, uma vez que são a base da cadeia alimentar nos oceanos e rios. O termo microalga engloba uma série de microrganismos de natureza distinta, incluindo tanto organismos procarióticos (cianobactérias) como eucarióticos (algas de dimensões microscópicas) (LOURENÇO, 2006).

Segundo Barsanti e Gualtieri, (2006) o tamanho das microalgas varia entre 20-200 μm e estima-se que existam entre 200 a 800 mil espécies de microalgas no mundo

(RATHA e PRASANNA, 2012), mas apenas um número limitado de aproximadamente 50 mil já foram identificadas e analisadas (PARMAR *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, as microalgas são classificadas quanto ao tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva e constituintes da parede celular, além de critérios citológicos e morfológicos tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, a forma de divisão celular, a presença de um envolvimento de retículo endoplasmático em torno do cloroplasto, e possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (TOMASELLI, 2004). Dentre as classes mais importantes destacam-se as algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e as diatomáceas (*Bacillariophyta*) (BRENNAN e OWENDE, 2010; KHAN *et al.*, 2009).

As microalgas podem ser encontradas em diferentes lugares, desde rios de água doce até lagos salgados, mas também são encontradas em alguns tipos de solos terrestres, apresentando-se como células isoladas, agrupadas formando colônias ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de células. Estes microrganismos podem ou não apresentar motilidade; podem viver em associação simbiótica, entretanto a maioria é de vida livre; e têm tolerância para uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez e concentração de O₂ e CO₂ (LEE *et al.*, 2008; LOURENÇO, 2006; MATA *et al.*, 2010).

2.1.1 Tipos de metabolismo

As microalgas possuem uma notável variabilidade metabólica quanto à utilização de fontes de energia e carbono; diversas espécies são capazes de alterar o metabolismo como resposta às mudanças das condições ambientais estabelecidas. Dessa forma os principais tipos de metabolismo podem ser classificados em três grupos de acordo com a obtenção de energia e fonte de carbono: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (MATA *et al.*, 2010).

Embora algumas microalgas utilizem diversas fontes de carbono para se desenvolver (CHEN, 2006), a maioria das espécies são autotróficas obrigatórias, não crescendo na ausência de luz e de carbono inorgânico (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

As microalgas autotróficas utilizam a luz como fonte de energia e requerem compostos inorgânicos como fonte de carbono para, através do processo de fotossíntese, realizar suas funções vitais. A fonte de carbono inorgânico pode ser proveniente de CO₂

do ar ou pode ser obtido a partir de carbonatos (SUKAHARA e AWAYAMA 2005; ESHAQ *et al.*, 2010).

Os cultivos autotróficos têm um apelo ambiental, uma vez que o dióxido de carbono atmosférico, um dos principais gases do efeito estufa, pode ser utilizado na produção da biomassa de microalgas para a produção de biocombustíveis, o que ocasionaria um balanço energético favorável (MANDAL e MALLICK, 2009; YOO *et al.*, 2010).

Segundo Yan *et al.* (2011) é necessário que ocorra um equilíbrio, pois sob baixa iluminação, a energia disponível é insuficiente, enquanto sob excesso de luz ocorre fotoinibição. Atualmente, a produção autotrófica é o método tecnicamente e economicamente mais viável para a produção em larga escala da biomassa de microalgas (SALAMA *et al.*, 2017).

No metabolismo heterotrófico, as microalgas têm um crescimento independente da energia luminosa e requerem uma fonte externa de compostos orgânicos, bem como a disponibilidade de nutrientes para que desempenhem seus processos metabólicos sem a presença de luz (LIANG, 2013; XIONG *et al.*, 2008).

Ressalta-se que até mesmo as microalgas autotróficas são capazes de oxidar compostos orgânicos para obter energia. O que difere estas microalgas das heterotróficas é a origem destes compostos orgânicos; nas autotróficas o carbono orgânico tem origem do processo interno de fotossíntese, enquanto que nas heterotróficas, o carbono orgânico é captado do meio externo (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). O crescimento heterotrófico oferece a viabilidade de aumentar consideravelmente a concentração e a produção de biomassa de microalgas, entretanto os processos industriais heterotróficos são afetados devido ao número limitado de espécies de microalgas heterotróficas disponíveis e à inibição do crescimento por substratos orgânicos em baixas concentrações (CHEN *et al.*, 2011).

A escolha pelo metabolismo heterotrófico é questionada, pois a necessidade de adição de uma fonte de carbono orgânico pode acarretar custos elevados e inviabilizar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas (FENG *et al.*, 2011a; LIANG *et al.*, 2013). Entretanto, pesquisas têm demonstrado que os compostos orgânicos dissolvidos em águas residuais podem ser utilizados como fonte de nutrientes para o cultivo com custo baixo (ZHANG *et al.*, 2014).

Como relatado por Perez-Garcia *et al.* (2011) no cultivo heterotrófico de algumas espécies de microalgas, a fonte de carbono orgânico pode ser fornecida a partir glicose, glicerol, ácidos graxos de cadeia curta e acetato.

Além dos metabolismos citados, é comum observar outro processo metabólico, o mixotrófico. Este equivale ao autotrófico e ao heterotrófico combinados, onde as microalgas realizam fotossíntese e também conseguem assimilar, concomitantemente, compostos orgânicos como fonte de carbono para o crescimento (ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014; MATA *et al.*, 2010).

O cultivo em condições mixotróficas tem se mostrado como uma opção versátil, pois utiliza como fonte de energia a luz e compostos orgânicos e, como fonte de carbono, compostos inorgânicos e orgânicos (ZHANG *et al.*, 2014).

2.1.2 Formas de condução dos cultivos de microalgas

Quanto às formas de condução dos cultivos, destacam-se os cultivos em batelada, semicontínuos e contínuos.

O cultivo em batelada é a maneira mais simples de cultivar microalgas, o qual possui um tempo determinado e é caracterizado por modificações intensas na composição do meio de cultura e pelo efeito de sombreamento causado pela concentração celular. As células são inoculadas no meio de cultivo no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes.

No regime em batelada, as etapas de crescimento celular são bem definidas (Figura 2.1):

1 - Fase de adaptação ou Fase lag: representa a fase de adaptação celular, ocorre devido ao período de adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo ou à presença de células inviáveis no inóculo, podendo ser extensa na presença de compostos tóxicos ou de nutrientes dificilmente metabolizáveis;

2- Fase exponencial ou Fase log: é a fase de crescimento na qual a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos regulares de tempo, as células se dividem como uma função exponencial do tempo, enquanto substratos, luz e temperatura adequada estiverem disponíveis;

3 - Fase de redução do crescimento relativo ou de transição: nesta etapa, o tempo requerido para a duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto é consequência da redução da concentração de nutrientes disponíveis

no meio (os quais foram assimilados pelas microalgas) e, principalmente, da redução da atividade fotossintética devido ao incremento da densidade microalgal, sendo que desta forma, a quantidade de energia luminosa por célula torna-se bastante reduzida;

4 - *Fase estacionária*: nesta etapa o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pelo acúmulo de produtos inibitórios do metabolismo. Como consequência, a velocidade de crescimento diminui e iguala a taxa de morte. As microalgas mantêm por algum tempo a concentração de biomassa constante devido à utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido à lise de outras células;

5 - *Fase de declínio ou de morte*: é o resultado da depleção de nutrientes e do autossombreamento a um nível que não suporta o crescimento, bem como da possível ocorrência de um nível tóxico de metabólitos (YUAN-KUN e HUI, 2004; LOURENÇO, 2006).

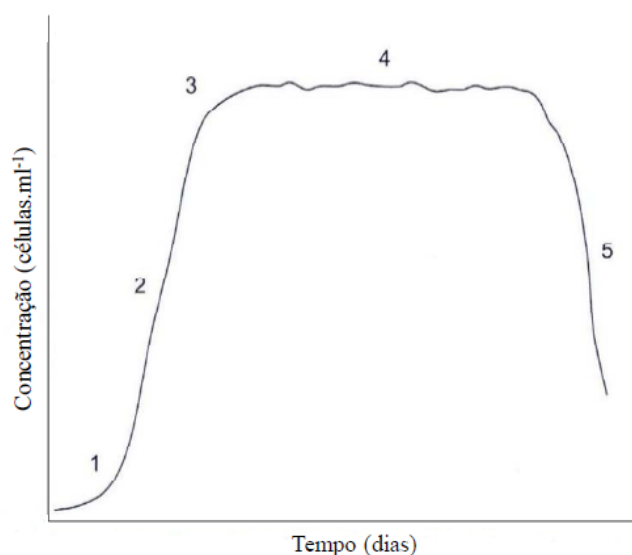


Figura 2.1: Curva de crescimento típica de microalgas em cultivo em batelada, com as etapas de crescimento identificadas. 1. *Fase de adaptação ou Fase lag*; 2. *Fase exponencial ou Fase log*; 3. *Fase de redução do crescimento relativo ou de transição*; 4. *Fase estacionária*; 5. *Fase de declínio ou de morte*.

Este regime de cultivo apresenta diversas vantagens, entre elas a simplicidade de manutenção e versatilidade do biorreator, sendo possível alterar facilmente as condições do crescimento a fim de estudos cinéticos. Em contrapartida, a maior desvantagem é a baixa eficiência, além de haver tempos mortos onde não há real uso do biorreator, como no preparo do biorreator, esterilização do meio de cultivo e preparo do inóculo. O efeito do autossombreamento é outro problema existente que ocorre quando a densidade

celular cresce muito e dificulta a penetração da luz no interior do cultivo (LOURENÇO, 2006).

Para a obtenção de um produto homogêneo e de forma ininterrupta pode-se utilizar fotobiorreatores operando em modo contínuo. Nestes cultivos há um processo permanente de alimentação do meio de cultura, sendo o volume de cultivo mantido através da retirada de biomassa a uma vazão constante. A conservação do volume invariável no biorreator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, no qual a concentração de células e de substrato permaneça constante ao longo do tempo de operação (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Neste processo é observado o crescimento balanceado das microalgas, em que as células são mantidas em estado exponencial. Entretanto, em muitos casos o modo de operação contínuo não se torna viável, econômica ou tecnicamente.

Uma aproximação desse processo contínuo é o modo semicontínuo, que consiste em um sistema onde há a retirada de produto e subsequente adição de meio de cultivo em intervalos de tempos periódicos, geralmente quando a quantidade de biomassa presente é elevada. Esse procedimento é normalmente realizado com o cultivo ainda jovem, na fase exponencial, no qual as células apresentam estado fisiológico muito favorável, no sentido de não sofrer com o efeito da diluição do meio de cultura, colocando o cultivo em um ciclo teoricamente sem limites (BORZANI, 2001; LOURENÇO, 2006). Este tipo de cultivo busca evitar o custo com o preparo de um novo inóculo para cada batelada, além de eliminar o tempo para obtenção do inóculo, bem como o consumo de nutrientes para isto.

2.1.3 Sistemas para cultivos de microalgas

De acordo com Dasgupta *et al.* (2010), os sistemas para cultivos podem ser classificados em dois tipos principais: sistemas abertos (tanques aerados, *raceway*, *ponds* e lagos) e os sistemas fechados (tubular, reator em placa, cônico, piramidal e fermentador). A escolha do sistema é influenciada pelas características do local de cultivo, pela espécie utilizada, quantidade de luz necessária, sistema de recuperação da biomassa e aplicação da biomassa.

Os sistemas abertos são métodos de cultivo de microalgas em larga escala mais comumente empregados. Neste tipo de sistema, as microalgas são cultivadas em lagoas

ou tanques ao ar livre, expostos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação. Estes tanques são geralmente rasos (profundidade que varia de 10 a 50 cm), de modo que permita a difusão de dióxido de carbono proveniente da atmosfera e a penetração da luz solar (CHISTI, 2007). São construídos em concreto, fibra de vidro ou policarbonato, com fundo de terra ou revestidos com material plástico, onde as culturas são mantidas em circulação constante (RAWAT *et al.*, 2013). De acordo com Richmond (2004), para que as microalgas possam receber a energia solar suficiente para crescer, o nível de água não pode ser superior a 15 cm (ou 150 L.m^{-2}).

Nos cultivos de microalgas em grande escala, a agitação e/ou aeração do sistema acarreta na oxigenação do cultivo, aporte de CO_2 ao meio de cultura, exposição de todos os indivíduos à luz e acesso homogêneo das microalgas aos nutrientes (LOURENÇO, 2006).

Os sistemas abertos mais utilizados em larga escala são lagoas abertas, os tanques circulares com um misturador mecânico e os tipos *raceway* (Figura 2.2). Os tanques tipo *raceway* (Figura 2.2a) são responsáveis por mais de 90% da produção mundial de microalgas (OJAMAE, 2011).



(a)



(b)



(c)

Figura 2.2: Exemplos de sistemas abertos para produção de microalgas. (a) sistemas tipo raceways de cultivo de *Nannochloropsis* sp. no Japão, (b) produção de *Dunaleilla*

salina em lagoa abertas na Austrália e (c) lagoa circular para a produção de *Chlorella* em Taiwan.

Fonte: Borowitzka (2005); Greenwell *et al.* (2010).

Nos sistemas fechados é comum a utilização de fotobiorreatores, que têm como princípio fundamental de todos os projetos aumentar a disponibilidade de luz para cada célula (SUALI e SARBATLY, 2012). Os fotobiorreatores são construídos com materiais opticamente transparentes, como vidro e materiais poliméricos (principalmente acrílico), permitindo melhor captação luminosa (BRENNAN e OWENDE, 2010; HARUN *et al.*, 2010).

Os cultivos em fotobiorreatores fechados (Figura 2.3) possibilitam o controle de diversos parâmetros importantes. As condições de cultivo, tais como: concentração de nutrientes, temperatura, luz, pH e injeção de CO₂ podem ser ajustadas para a obtenção de maior produção de biomassa de microalga em relação aos sistemas abertos (RAWAT *et al.*, 2013).

As principais vantagens deste sistema são: menor risco de contaminação, menores perdas de CO₂, maior reprodutibilidade de condições e cultivos, menor perda por evaporação e design variado de acordo com as necessidades e possibilidades disponíveis (MOLINA GRIMA *et al.*, 1999; MOLINA GRIMA *et al.*, 2000; PULZ, 2001). A densidade celular alcançada em cultivos realizados em sistemas fechados é alta devido ao controle que se possui do ambiente de cultivo (LEE, 2001; UGWU *et al.*, 2008). Entretanto, as principais desvantagens deste sistema que se destacam são a dificuldade de ampliação, deterioração do material transparente utilizado, alto custo de construção (investimento 10 vezes maior que do tanque aberto) e possíveis danos às células pelo estresse de cisalhamento (BRENNAN e OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).



Figura 2.3: Fotobiorreator tubular em operação
Fonte: Greenwell *et al.* (2010).

Chisti (2007) ressalta as vantagens da produção de microalgas em fotobiorreatores, em comparação aos tanques de recirculação. De acordo com o autor, a produtividade volumétrica dos fotobiorreatores é 13 vezes maior que a dos tanques abertos. Além disso, assumindo uma produtividade similar entre os dois equipamentos, a quantidade de área requerida para os cultivos em fotobiorreatores fechados é favorecida, sendo aproximadamente 30% inferior aos tanques abertos.

Segundo Molina Grima *et al.* (2003) os custos de separação também representam uma vantagem dos sistemas fechados, pois o cultivo é 30 vezes mais concentrado que nos tanques de recirculação, facilitando assim a separação da biomassa.

De acordo com Chisti (2007) o custo de produção para cada quilograma de biomassa é estimado em US\$ 2,95 para fotobiorreatores e US\$ 3,80 para tanques *raceways*. Segundo o autor, se a capacidade anual de produção de biomassa ultrapassar 10.000 toneladas, os custos de produção por quilograma reduzem para US\$ 0,47 e US\$ 0,60, para fotobiorreatores e tanques de recirculação, respectivamente, por causa da economia de escala.

2.1.4 Fatores que influenciam a produção de biomassa

A interação entre fatores físicos, químicos e biológicos influencia diretamente no cultivo de microalgas, podendo promover ou inibir seu crescimento. Os fatores físicos e químicos estão relacionados aos efeitos provocados pela temperatura, pH, luz,

salinidade e disponibilidade de nutrientes, enquanto que os fatores biológicos estão associados ao metabolismo celular da espécie cultivada e à influência de contaminantes no sistema (TANG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011). A seguir serão apresentados os principais fatores que influenciam os cultivos e os efeitos causados sobre o crescimento das microalgas.

2.1.4.1 Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos, além de influenciar na composição da biomassa e na estrutura dos componentes celulares (proteínas e lipídios). Temperaturas abaixo do nível ótimo de crescimento, geralmente, aumentam o grau de insaturação dos lipídios nas membranas. Por outro lado, altas temperaturas induzem a produção de carotenóides. O aumento na temperatura nos cultivos também influencia o consumo de nitrogênio e carbono, bem como o tamanho celular (HU, 2004).

Para algumas espécies, a elevação da temperatura pode diminuir a quantidade de ácidos graxos insaturados e aumentar a quantidade de ácidos graxos saturados (THOMPSON *et al.*, 2004). Este fator pode contribuir para a produção de biodiesel de melhor qualidade, elevando o número de cetanos e aumentando a estabilidade oxidativa do combustível. Entretanto, temperaturas muito elevadas provocam a ruptura das membranas celulares uma vez que a dupla camada lipídica se altera por ação do calor (SINOGAS *et al.*, 2003/2004). Temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam mais estabilidade nos experimentos, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies (LOURENÇO, 2006).

Breuer *et al.* (2013) estudaram o impacto do pH e da temperatura na produção de biomassa e na acumulação de lipídios na forma de triacilgliceróis (TAG) na microalga *Scenedesmus obliquus*. As experiências foram realizadas em todas as combinações de pH 5, 7 e 9, e temperaturas 20 °C, 27,5 °C e 35 °C, com a mesma intensidade de luz incidente de 500 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A maior concentração final de biomassa e a maior produtividade da biomassa foram observados a pH 7 e temperatura de 27,5 °C. Esta condição também resultou em um maior acúmulo de TAG.

Rukminasari (2013) verificou que a microalga *Scenedesmus* sp. atingiu uma maior densidade celular quando cultivada a 25 °C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Xin *et al.* (2010) onde observaram que na temperatura de cultivo de 25 °C a microalga *Scenedesmus* sp. apresentou a taxa máxima de crescimento específico.

Han *et al.* (2013) cultivaram a microalga *Chlorella pyrenoidosa* ao ar livre sob um ciclo claro/escuro. Os resultados mostraram que 30 °C foi a temperatura diurna ideal para atingir máxima concentração de biomassa e altos teores de lipídios. De acordo com os autores, aumentar a temperatura diurna pode diminuir a perda de biomassa noturna e estimular a acumulação de lipídios.

2.1.4.2 pH

O pH afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos, que podem não solubilizar e precipitar em função disso. Assim, o pH favorável para o crescimento da maioria das microalgas é sempre próximo da neutralidade, para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (LOURENÇO, 2006). Os valores de pH baixos desempenham papel como inibidor enzimático no processo de fotossíntese (YANG *et al.*, 2011).

O crescimento da microalga envolve o consumo do CO₂ dissolvido no meio, acarretando a elevação do pH (> 10) (PIRES *et al.*, 2012). Baixas concentrações dos íons carbonato e bicarbonato também estão relacionadas com o aumento do pH. Este aumento de pH pode ser benéfico pela inativação de patógenos em tratamentos biológicos de esgoto, porém pode inibir o crescimento das microalgas (KUMAR *et al.*, 2010).

Bakuei *et al.* (2015) verificaram máxima produção de biomassa de 3,23 g.L⁻¹ quando cultivaram *Scenedesmus* sp. a pH 8. Este valor de concentração de biomassa é aproximadamente o triplo do valor encontrado para o cultivo nos pHs 7, 7,5, e 8,5.

Maiores produtividades de biomassa (407 ± 5,5 mg de biomassa.L⁻¹.dia⁻¹) e lipídios (99 ± 17,2 mg de lipídio.L⁻¹.dia⁻¹) foram relatados por Moheimani, (2013), quando cultivou a microalga *Chlorella* sp. em pH 7. Neste estudo, as produtividades de biomassa e lipídios foram na ordem de grandeza de pH 7 > pH 7,50 = pH 8 > pH 6,5 > pH 6 > pH 5,5.

2.1.4.3 Agitação do meio

A agitação nos cultivos de microalgas está relacionada a uma série de fatores que influenciam no crescimento e na produtividade da biomassa (SUH e LEE, 2003). Uma agitação adequada evita a formação de aglomerados celulares, garante a incidência luminosa uniforme às células, auxilia a troca de gases favorecendo a captação de CO₂ da atmosfera e a liberação de O₂ do interior do meio de cultivo, diminui o efeito da

estratificação térmica bem como propicia melhor distribuição dos nutrientes (SOARES, 2010).

Em cultivos de bancada a agitação pode ser obtida com auxílio de mesa agitadora (incubadoras do tipo *shaker*), ou mesmo aeração dos frascos de cultivo através da introdução de ar atmosférico ou enriquecido com CO₂.

Em sistemas abertos como lagoas e tanques, é necessária a utilização de pás giratórias ou a recirculação da cultura através de bombeamento mecânico. No caso do sistema fechados, tais como fotobiorreatores, a agitação do meio é realizada por bombas mecânicas ou por borbulhamento de ar (LOURENÇO, 2006; BRENNAN e OWENDE, 2010).

2.1.4.4 Intensidade luminosa

A intensidade e duração da exposição luminosa são importantes fatores ambientais no crescimento dos microrganismos fotossintetizantes por ser a principal fonte de energia (MASOJÍDEK *et al.*, 2004).

De acordo com Behrens (2005) a luz é o principal fator a ser controlado na otimização do processo de crescimento, seguindo-se a temperatura, o pH e a presença de CO₂ e O₂ no meio. Derner *et al.* (2006) ressaltam que a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético está diretamente relacionada ao carbono que será fixado pelas microalgas e assim influenciará na produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas.

Níveis extremos de luminosidade nos cultivos de microalgas podem produzir um efeito desfavorável ao crescimento, a chamada fotoinibição. O processo fotoinibitório ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin, assim as moléculas de clorofila ficam em estado excitado e acabam produzindo substâncias tóxicas as células como o peróxido de hidrogênio (MOLINA GRIMA *et al.*, 1999; HIRAYAMA *et al.*, 1996).

A luz natural pode ser utilizada em vários sistemas de cultivos, o que reduz os custos de produção. Entretanto, as variações ambientais e a falta de controle do fotoperíodo da intensidade luminosa fazem com que os cultivos que utilizem luz natural não sejam estáveis (BECKER, 1994).

O efeito inibitório da luz (fotoinibição) foi observado por Vonshak *et al.* (2000), no crescimento da microalga *Spirulina platensis* a uma intensidade luminosa de

250 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo esta inibi\u00e7\u00e3o mais acentuada em culturas autotr\u00f3ficas que mixotr\u00f3ficas.

Um aumento na produ\u00e7\u00e3o de biomassa correspondente \u00e0 intensidade da luz, foi observado por Liu *et al.* (2012), quando investigaram os efeitos da intensidade luminosa em tr\u00eas n\u00edveis: 50, 250 e 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, no crescimento e produ\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios da microalga *Scenedesmus* sp. sob condi\u00e7\u00f5es limitadas de nitrog\u00eanio. Neste estudo a maior concentra\u00e7\u00e3o de biomassa (3,88 g.L^{-1}) e o maior teor de lip\u00eddios (41,1%) foram obtidos quando a microalga cresceu em condi\u00e7\u00f5es de luz de 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Pancha *et al.* (2015) verificaram um aumento no teor de lip\u00eddios de 21,34% para 23,62% e no teor de carboidratos de 35,34% para 42,58% quando aumentaram a intensidade luminosa de 30 para 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em cultivos de *Scenedesmus* sp. A acumula\u00e7\u00e3o desses produtos de armazenamento deve-se principalmente a uma maior gera\u00e7\u00e3o de fluxo metab\u00f3lico em alta irradia\u00e7\u00e3o, que, em \u00faltima inst\u00e2ncia, \u00e9 direcionada para a acumula\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios e carboidratos em microalgas (RAMANAN *et al.*, 2013).

Krzemi\u0144ska *et al.* (2015) relataram que o aumento da intensidade luminosa ocasionou um aumento da taxa de crescimento espec\u00edfico e uma redu\u00e7\u00e3o do tempo de duplica\u00e7\u00e3o da microalga *Chlorella protothecoides* quando cultivada sob baixa luminosidade (35 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), m\u00e9dia luminosidade (130 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e alta luminosidade (420 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os autores tamb\u00e9m verificaram um consider\u00e1vel aumento no conte\u00fado lip\u00eddico de 24,8% para 37,5% com o aumento da intensidade da luz. Al\u00e9m disso, a composi\u00e7\u00e3o dos \u00e9steres met\u00edlicos de \u00e1cidos graxos foi afetada pela intensidade da luz, com os \u00e1cidos graxos C16-18 aumentados de 76,97% para 90,24% dos \u00e1cidos gordurosos totais e o teor de \u00e1cido linol\u00eanico (C18-3) foi reduzido com o aumento da intensidade luminosa.

2.1.4.5 Salinidade

A salinidade afeta o crescimento das microalgas em virtude do estresse osm\u00f3tico relacionado com o teor de \u00edons e das modifica\u00e7\u00f5es nas propor\u00e7\u00f5es i\u00f4nicas celulares devido \u00e0 permeabilidade seletiva da membrana aos \u00edons. Al\u00e9m disso, a concentra\u00e7\u00e3o elevada de alguns \u00edons pode apresentar toxicidade para as microalgas (VAN DAM *et al.*, 2014).

Altera\u00e7\u00f5es nas concentra\u00e7\u00f5es da salinidade nos meios de cultivo provocam mudan\u00e7as na composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica das microalgas, influenciando diretamente na

síntese de lipídios e carboidratos. Diferentes autores relataram que o aumento da concentração da salinidade (na forma de cloreto de sódio) e a diminuição de alguns nutrientes acarretam o aumento da concentração de carboidratos (VONSHAK, 1997; RICHMOND, 2004; LOURENÇO, 2006; BARROS, 2010).

A tolerância de *Scenedesmus almeriensis* a concentrações de sal (NaCl) foi relatada por Sanchez *et al.* 2008, onde foi encontrada maior produtividade de biomassa em cultivos contendo 5,85 g.L⁻¹ de NaCl em comparação com meios sem a presença NaCl. No entanto, em espécies de microalga tais como a *Chlorella* sp., concentrações do sal cloreto de sódio (NaCl) superior a 4,2 g.L⁻¹ apresentaram toxicidade para cultivos (VAN DAM *et al.*, 2014).

De acordo com Benavente-Valdés *et al.* (2016) o aumento da salinidade pode aumentar o teor lipídico das microalgas, mas pode diminuir a taxa de crescimento. Elevados teores de lipídio (33,13%) e carboidratos (35,91%) acumulados foram relatados por Pancha *et al.* (2015), quando cultivaram a microalga *Senedesmus* sp. em meio de cultivo contendo 7.200 mg.L⁻¹ de NaCl.

2.1.4.6 Nutrientes

O meio de cultivo para microalgas é composto basicamente por macronutrientes tais como carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K) e micronutrientes tais como ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e cobalto (Co). Algumas microalgas também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GUILLARD, 1975). Os principais elementos limitantes do crescimento são o carbono, nitrogênio, o fósforo e o ferro (LOURENÇO, 2006, RICHMOND, 2004).

Fortier e Sturm (2012) citam que a biomassa microalgal tem composição típica de C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P, portanto, a exigência nutricional pode ser estimada com relação 106C:16N:1P μmol.L⁻¹ ou o equivalente a 42:7:1 mg.L⁻¹, proporção essa conhecida como o Número de Redfield (ANDERSEN, 2005; RICHMOND, 2004). Contudo a relação N:P na biomassa algácea pode variar de 4:1 para quase 40:1, dependendo da espécie e da disponibilidade de nutrientes. Sob condições adequadas, uma alta produtividade pode ser alcançada mesmo em relações N:P relativamente baixas (PARK *et al.*, 2011).

O carbono é considerado um dos nutrientes mais importantes, uma vez que constitui cerca de 50% da biomassa microalgal. Sua elevada demanda decorre do fato de

que este componente é o constituinte principal de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, entre outros). No meio de cultivo da microalga, o carbono pode estar nas formas inorgânica como dióxido de carbono (CO_2), ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) (MOHEIMANI, 2013; CAI *et al.*, 2013), ou na forma orgânica como os carboidratos e ácidos orgânicos (LIANG *et al.*, 2009), destacando-se a glicose, o acetato (ácido acético) e o glicerol, bem como o amido (WEI *et al.*, 2009).

A composição bioquímica da biomassa de microalgas pode ser influenciada pela fonte e pela concentração de carbono no meio de cultivo (LIANG *et al.*, 2009).

Sob condições mixotróficas, onde há a assimilação de carbono orgânico e inorgânico simultaneamente, algumas microalgas aumentam a concentração de biomassa e sua taxa de crescimento, além de produzirem uma maior quantidade de ácidos graxos (MATA *et al.*, 2010).

Girard *et al.* (2014) estudaram o cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing em condições fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica, utilizando soro de leite como fonte de carbono. O cultivo mixotrófico apresentou a maior taxa de crescimento específico de $1,083 \text{ d}^{-1}$. Li *et al.* (2014) utilizaram glicose como fonte de carbono e verificaram maior concentração de biomassa da microalga *Chorella sorokiniana* quando cultivada mixotroficamente, onde a biomassa seca final foi 2,4 e 5,2 vezes maior do que os cultivos heterotróficos e autotróficos, respectivamente.

O fósforo apresenta importantes funções na célula, estando associado a todos os processos que envolvem trocas energéticas e na constituição de moléculas como o ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. A assimilação do fósforo por parte das microalgas ocorre principalmente em formas inorgânicas, como o ortofosfato (PO_4^{3-}) e os polifosfatos (LOURENÇO, 2006). As concentrações de fósforo para um ótimo crescimento diferem consideravelmente entre espécies, até mesmo não existindo fator externo limitante (RICHMOND, 2004). As microalgas são capazes de acumular de 8 a 16 vezes a quantidade mínima necessária, o que garante o crescimento da célula mesmo que novas fontes de fósforo não estejam disponíveis (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007).

Qu *et al.* (2008) relataram a assimilação de fosfato pela microalga *Chlorella pyrenoidosa* na produção de biomassa sob condições de cultura heterotróficas, mixotróficas e autotróficas. Durante as culturas heterotróficas, a produção final de biomassa sob deficiência de fosfato foi menor, enquanto que em condições mixotróficas

e autotróficas observou-se uma máxima assimilação de fosfato e maior produção de biomassa.

A acumulação de lipídios e carboidratos pode ser melhorada manipulando os níveis de fósforo no meio de cultura. Liang *et al.* (2013) relataram o efeito da concentração de fósforo no acúmulo de lipídios pela microalga *Chlorella* sp. Neste estudo os autores verificaram que o acúmulo de lipídios nas células foi aumentado quando o cultivo foi realizado com baixa concentração de fósforo (1 mg.L^{-1}), indicando que a *Chlorella* sp. pode acumular lipídios sob condições desfavoráveis ao fósforo. Este efeito também foi observado em *Scenedesmus* sp., onde um aumento no teor de lipídios em 35% foi observado quando a inanição de fósforo foi utilizada (WU *et al.*, 2015).

Margarites *et al.*, (2014) avaliaram o efeito das concentrações de nitrogênio e fosfato sobre os teores de carboidratos da biomassa da microalga *Chlorella minutissima*. Os cultivos foram realizados em meio Basal seguindo um planejamento de Box-Behnken com concentrações de KNO_3 entre 0 e $0,250 \text{ g.L}^{-1}$ e de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ entre 0 e $0,175 \text{ g.L}^{-1}$. As análises dos efeitos evidenciaram que a *Chlorella minutissima* cultivada com a adição de $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ do componente nitrogenado (KNO_3) e sem adição de componentes fosfatados (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) apresentou maior rendimento em carboidratos ($0,030 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

O teor de proteína na microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio Chu-10 contendo quatro diferentes concentrações de fósforo (0, 2, 4, 6, g.L^{-1}) foi investigado por Baiee e Salman (2016). Os autores observaram um aumento de 51,17% e 75,56% quando utilizaram as concentrações de 4 g.L^{-1} e 6 g.L^{-1} frente ao cultivo com inanição de fósforo.

O nitrogênio compõe em média cerca de 7-10% do peso seco da biomassa microalgal e é essencial à constituição das proteínas estruturais e funcionais das células algais (HU, 2004).

As microalgas podem assimilar nitrato, amônia e outras fontes orgânicas de nitrogênio, como uréia; adicionalmente, algumas microalgas podem fixar o nitrogênio atmosférico (BECKER, 1994). O consumo de nitrato pelas microalgas utiliza enzimas para reduzir o nitrogênio em uma forma assimilável. Primeiramente o nitrato é transportado para dentro da célula por uma proteína transportadora de nitrato e reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase, e, posteriormente, para amônia pela nitrito redutase (HATORY e MYERS, 1966). Já a amônia é incorporada ao metabolismo através da ação de transaminases, para a formação de aminoácidos (HUNG *et al.*, 2000).

A utilização de fontes de nitrogênio inorgânico na forma reduzida (nitrogênio amoniacal) é energeticamente favorável em comparação com nitratos e nitritos, disponibilizando energia para o crescimento celular. Quando há disponibilidade de nitrogênio inorgânico no cultivo ocorre o aumento das concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila, porém, conforme se limita o nitrogênio do meio, reduzem-se as quantidades dessas substâncias (LOURENÇO, 2006).

A escassez de nitrogênio no meio de cultivo pode aumentar o conteúdo lipídico de uma microalga (SANTOS *et al.*, 2003). Devido ao fato que a depleção de nitrogênio direciona o metabolismo das microalgas antes voltado à multiplicação celular para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, preparando a célula para um período de privação nutricional (ALONSO *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2012).

Vasileva *et al.* (2016) investigaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, ureia e nitrato de amônio + ureia) sobre o crescimento, o teor de proteínas, carboidratos e lipídios da microalga *Scenedesmus* sp.. Embora as duas fontes de nitrogênio estejam rotineiramente presentes no meio de cultivo, o uso de meio com cada uma delas separadamente proporcionou um melhor rendimento de biomassa de algas durante todo o período de cultivo. O melhor crescimento foi observado em meio contendo uréia, onde a concentração de biomassa atingiu 9,0 g.L⁻¹. Os carboidratos, seguidos por proteínas e lipídios, dominaram a composição bioquímica de *Scenedesmus* sp. A biomassa da microalga cultivada em meio contendo uréia ou nitrato amônia foram caracterizada por conter teores semelhantes de proteínas (29%), carboidratos (41%), e lipídios (24%).

Agirman e Cetin (2015) verificaram uma aumentou de 80% no teor de lipídios acumulado na biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* quando cultivada em meio com 50% de inanição de nitrogênio.

Em culturas de *Chlorella*, o esgotamento do nitrogênio no meio de cultura, cessou a divisão celular e o teor de lipídios das células aumentou de 28% para 70%. Foi observado simultaneamente um decréscimo no conteúdo protéico de 30% para 8% (ROUND, 1973).

2.1.5 Métodos de recuperação da biomassa microalgal

A natureza diluída das culturas de microalgas faz com que a recuperação da biomassa algal possa representar de 20 a 30% dos custos totais de produção (MOLINA

GRIMA *et al.*, 2003; UDUMAN *et al.*, 2010). A escolha do processo de recuperação da biomassa é dependente das características das microalgas e do destino da biomassa separada. O processo deve ser simples, rápido, eficiente para o maior número de microalgas, de baixo custo e utilizar o mínimo possível de energia e reagentes químicos (CHEN *et al.*, 2011; KIM *et al.* 2013).

A recuperação das microalgas pode ser por centrifugação, filtração e coagulação/floculação. Devido às pequenas dimensões (3 a 30 μm) e baixas concentrações de biomassa, a utilização de centrífugas para a recuperação da biomassa apresenta elevados custos relacionados ao gasto energético, sendo justificada apenas para bioprodutos de alto valor, como carotenóides ou ácidos graxos poliinsaturados. As tecnologias de filtração são apropriadas apenas para a recuperação de espécies relativamente grandes como a *Spirulina*. Para espécies de tamanho reduzido como *Chlorella* e *Scenedesmus* esta tecnologia é ineficiente (BOROWITZKA *et al.*, 2013; RAWAT *et al.*, 2013; MOLINA GRIMA *et al.*, 2003). Além disso, as microalgas possuem suas superfícies negativamente carregadas, o que resulta numa suspensão de microalgas estável, dificultando a sedimentação por gravidade (BRENNAN e OWENDE, 2010; BARRUT *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013). A combinação de diferentes técnicas pode compensar as deficiências das técnicas individuais, e muitas vezes resultam em um efeito positivo sobre o processo de colheita (BRENNAN e OWENDE, 2010).

De acordo com Uduman *et al.* (2010), devido à variabilidade na composição da biomassa, a qual é constituída de diferentes características como o tamanho, forma e motilidade, é difícil selecionar uma única técnica de recuperação de biomassa que contemple todos estes parâmetros e que ainda, possa vir a se tornar um método padrão para ser adotado em escala industrial.

Devido à superfície negativamente carregada das microalgas, que cria uma força de repulsão, impedindo a aglomeração e a sedimentação dessas partículas, o processo de coagulação/floculação química vem sendo estudado como uma forma de desestabilizar e aumentar o tamanho das partículas, facilitando assim a remoção da biomassa do meio de cultivo (CHRISTENSON e SIMS, 2011). O processo de coagulação/floculação é utilizada para concentrar uma suspensão diluída de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de matéria seca 20 - 100 vezes para uma concentração final de material sedimentado de 10 - 50 g.L^{-1} (WILEMAN *et al.*, 2012). Estes processos são baseados na adição de substâncias

químicas que agem neutralizando ou reduzindo a carga superficial, induzindo a agregação das células de microalgas (DE GODOS *et al.*, 2011).

Muito embora apresente elevada eficiência de remoção da biomassa, algumas características podem ser apontadas como desvantagens do processo: grandes concentrações de flocculantes podem ser necessárias para promover a separação; o processo é altamente sensível a variações de pH; os flocculantes podem não apresentar a mesma eficiência para todos os grupos de microalgas e a biomassa das microalgas pode ser contaminada pela presença dos componentes químicos do flocculante, comprometendo a sua utilização futura (CHEN *et al.*, 2011; RAWAT *et al.*, 2013).

A escolha do coagulante ou flocculante ideal depende do tipo de uso ao qual a biomassa será submetida, ter baixo custo, ser atóxico e eficaz em baixa concentração. Os principais reagentes utilizados para flocculação de microalgas podem ser divididos em inorgânicos, sendo comuns íons Al^{3+} e Fe^{3+} e orgânicos, sendo os mais comuns os polímeros, também chamados de polieletrólitos, podendo ser catiônicos, aniônicos ou não iônicos, naturais ou sintéticos (USDE, 1984; MOLINA GRIMA, *et al.*, 2003).

Autores como Anthony *et al.* (2013b) e Kim *et al.* (2013) reforçam que o uso de coagulantes inorgânicos, como sulfato de alumínio e cloreto férrico, embora eficazes, requerem altas dosagens, resultando na contaminação da biomassa. Além disso, esses coagulantes podem acarretar lise celular e, por questões ambientais, o efluente do processo deve receber tratamento, o que muitas vezes pode ser oneroso. Estas desvantagens podem ser contornadas através da utilização de coagulantes orgânicos que apresentam elevadas recuperações de biomassa aliada à baixa dosagem, o que reduz o impacto sobre o meio ambiente, visto que estes compostos são biodegradáveis.

A maioria dos polímeros orgânicos que estão comercialmente disponíveis são sintéticos a base de poliacrilamida (GREGORY, 2013). Danquah *et al.*, (2009), Granados *et al.*, (2012) e Lam *et al.* (2014), aplicaram com sucesso polímeros sintéticos de poliacrilamida para flocculação de microalgas. Embora os polímeros sintéticos de poliacrilamida não sejam tóxicos, podem conter resíduos de acrilamida que apresentam uma toxicidade elevada para os organismos aquáticos (BOLTO, 2007).

Polímeros de base natural, tais como amido catiônico, quitosana e tanino vegetal estão sendo preferencialmente utilizados na recuperação de microalgas, particularmente quando a biomassa é utilizada para a alimentação animal, ou em processos da biorrefinaria (WIJFFELS, 2010).

Os coagulantes naturais à base de tanino vegetal são na sua maioria compostos polifenólicos solúveis em água com sua massa molar que varia entre 500 até alguns milhares de Daltons. Estes produtos são quimicamente complexos e normalmente são obtidos da casca de vegetais como *Schinopsis balansae* (Quebracho), *Castanea sativa* (Chestnut) ou *Acacia mearnsii de Wild* (Acácia-negra). Carboidratos simples, goma hidroxidoloidais, fenóis e aminoácidos são os principais constituintes dos taninos (BELTRÁN-HEREDIA e SÁNCHEZ-MARTÍN, 2009; BELTRÁN-HEREDIA *et al.*, 2010; GRAHAM *et al.*, 2008). A utilização dos taninos vegetais é amplamente difundida na indústria do couro, como agente curtente (GUTTERRES, 2007), bem como na remoção de contaminantes químicos (BELTRÁN-HEREDIA e SÁNCHEZ-MARTÍN, 2009) e turbidez no tratamento de águas residuais (GUTTERRES e MATOS, 2006; SÁNCHEZ-MARTÍN *et al.*, 2010).

Taninos catiônicos têm despertado interesse no campo de coagulantes, pois além de apresentarem vantagens ambientais, possuem a capacidade de atuar em sistemas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes entre as partículas, sendo este processo responsável pela formação de flocos e conseqüentemente sedimentação (BELTRÁN-HEREDIA, SÁNCHEZ-MARTÍN, 2009; BELTRÁN-HEREDIA, 2010).

Pereira e Monteggia (2003) observam eficiências de recuperação acima de 90% a partir da dosagem de 100 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio ou de tanino floculante Tanfloc SG em amostra proveniente de lagoa de estabilização contendo células do gênero *Scenedesmus* sp.

De Jesus (2014) utilizou Tanfloc como um agente coagulante para a recuperação da microalga *Chlorella* sp. por meio de coagulação. Os efeitos da concentração de coagulante, pH, tempo de mistura, a velocidade de agitação, e o tempo de sedimentação para a recuperação de biomassa foram investigados. O pH e a velocidade de agitação não afetaram o processo nas condições testadas. Uma recuperação de biomassa de 98,2 ± 1,0% foi obtida sob as seguintes condições: concentração de tanino 130 mg.L⁻¹, velocidade do agitador de 30 rpm, e tempo de sedimentação de 5 min. A coagulação com tanino resultou numa redução do teor total de carotenóides (acima de 5%) e o conteúdo de lipídios totais (acima de 8,6%).

De Godos *et al.* (2011) compararam dois floculantes convencionais (cloreto férrico e sulfato férrico) com cinco floculantes poliméricos quanto à capacidade de recuperação de biomassa formada por um consórcio simbiótico de microalgas e bactérias em um efluente de suinocultura. Nesta análise foi verificado que, enquanto

floculantes convencionais à base de sais de ferro alcançaram elevadas eficiências de remoção (66-98%) em concentrações de 0,15 - 0,25 g.L⁻¹, os floculantes poliméricos atingiram a mesma faixa de eficiência de remoção requerendo concentrações bastante inferiores (0,025 - 0,050 g.L⁻¹).

2.1.6 Composição química das microalgas e bioprodutos

As microalgas sintetizam importantes compostos tais como proteínas, lipídios, vitaminas, pigmentos e outros que podem ser destinados para alimentação humana e animal, fabricação de cosméticos, suplementos de saúde, e para a produção de energia (RAPOSO *et al.*, 2013; BARRA *et al.*, 2014). A composição bioquímica diversificada destes microrganismos está relacionada com a natureza de cada espécie e com as condições de cultivos, como nutrientes, temperatura, salinidade, fonte de carbono, intensidade luminosa, agitação, pH e fase de crescimento.

2.1.6.1 Proteínas

As proteínas são moléculas orgânicas de alto peso molecular, constituídas por cadeias poliméricas de aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Estes compostos biológicos estão relacionados a várias funções fisiológicas e desempenham papel importante na regeneração de tecidos e na catálise das reações químicas em organismos vivos (enzimas ou hormônios), sendo essenciais nas reações imunes e no processo de crescimento e reprodução (TOKUSOGLU e UNAL, 2003).

As proteínas, um dos principais constituintes da biomassa das microalgas, correspondem até 70% do peso seco. Entretanto, seu teor pode mudar drasticamente ao longo de seu ciclo de vida bem como com as condições de cultivo (LAURENS *et al.*, 2014). Diversas microalgas têm se destacado por seu teor de proteínas, tais como *Synechococcus* sp. (63% base seca), *Spirulina maxima* (60 - 71% base seca) e *Chlorella vulgaris* (51 - 53% base seca) (BECKER, 2007).

A fração proteica de microalgas pode ser ressaltada como fonte promissora para ração animal e suplementos alimentares, pois apresenta alta qualidade nutritiva e pode ser comparada com a de outras proteínas alimentares, devido ao seu perfil e proporção de aminoácidos (SPOLAORE *et al.*, 2006; BECKER, 2007).

O consumo humano de biomassa de microalgas é restrito a poucas espécies tais como *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* devido às normas de segurança alimentar,

fatores comerciais, demanda do mercado e preparação específica (PULZ e GROSS, 2004).

O uso de microalgas como ração animal é mais recente. Um grande número de avaliações nutricionais e toxicológicas demonstram a adequação de biomassa de algas como um valioso complemento ou como fonte substituinte de proteínas convencionais (farelo de soja, farinha de peixe, farelo de arroz, etc.) na ração animal (BECKER, 2007).

A composição química das microalgas é facilmente influenciada pela forma de cultivo podendo atingir taxas de crescimento elevadas e alta produtividade de biomassa com altas frações de proteína, quando induzidas. Coca *et al.* (2014) investigaram a produção de *S. platensis* em meio de cultura mineral suplementado com diferentes níveis de vinhaça e verificaram que a adição de 1 kg.m^{-3} de vinhaça aumentou consideravelmente a produtividade de proteína quando comparado com a forma não-suplementado. Salla *et al.* (2016) avaliaram os níveis de carboidratos e proteínas na biomassa da microalga *S. platensis* utilizando derivados do soro do leite, que contêm elevada concentração de lactose e níveis baixos de proteína. Os autores observaram um aumento nos níveis de carboidrato e uma redução do teor de proteína na biomassa.

2.1.6.2 Carboidratos

O carboidrato é um componente metabolicamente ativo nas células microalgais, seja como molécula de armazenamento, sujeitos às alterações estruturais durante o ciclo de vida ou como componente estrutural da parede celular; portanto estando envolvidos no crescimento celular (CRAIGIE, 1990). Os carboidratos em microalgas podem ser encontrados na forma de glicose, celulose, amido, pectina, xilana, manana e outros polissacarídeos (STENGEL *et al.*, 2011). Os monossacarídeos e oligossacarídeos constituem 45 – 90% da fração total de carboidratos (TAKEDA, 1996).

A biomassa de microalgas, vista como matéria-prima para a produção de bioetanol (CHEN *et al.*, 2011), representa uma potencial fonte de substrato fermentável uma vez que, de acordo com as condições de crescimento, elas podem ter níveis elevados de carboidratos na sua composição, diretamente disponíveis para a fermentação (FU *et al.*, 2010).

A porcentagem de carboidratos na biomassa depende das espécies de microalgas e das condições de cultivo e ambientais. Várias espécies de microalgas, tais como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutíssima*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus acutus*, *Tetraselmisem subcordiformis* e *Spirulina platensis*

destacam-se por acumularem uma grande quantidade de carboidratos (> 40% do peso seco) (JOHN *et al.*, 2011, RAZEGHIFARD, 2013; MARGATITES; COSTA, 2014; DRAGONE *et al.*, 2011; SALLA *et al.*, 2016).

A viabilidade da utilização da biomassa de microalgas no processo de produção de etanol tem sido relatada por vários autores (MIRANDA *et al.*, 2012; MARGATITES, 2014; MAGRO *et al.*, 2016).

Harun *et al.* (2010) avaliaram a utilização de células intactas e rompidas da espécie *Chlorococum* sp. na obtenção de etanol, por fermentação com *Saccharomyces bayanus*. Os autores concluíram que o maior rendimento foi o obtido a partir das células previamente rompidas. De acordo com Harun *et al.* (2010), para aumentar o rendimento da fermentação, os lipídios devem ser extraídos (rompimento da célula via extração por solvente e/ou mecânica), pois assim tanto os carboidratos presentes na membrana celular e no meio intracelular (armazenados no cloroplasto, por exemplo) estarão disponíveis para a fermentação

Margarites (2014) investigou a adição de glicose nas fermentações alcoólicas utilizando as biomassas das microalgas *Spirulina* sp. e *Chlorella pyrenoidosa* como substrato fermentativo. Neste estudo a autora verificou maior produtividade de etanol de 1,18 g.L⁻¹.h⁻¹ utilizando 50% dos carboidratos provindos da sacarificação da biomassa e 50% a partir da glicose.

2.1.6.3 Lipídios

Os lipídios são macromoléculas orgânicas classificados em três classes: lipídios neutros, lipídios compostos e lipídios derivados. Os lipídios neutros são constituídos pelas gorduras, que são ésteres formados a partir de ácidos graxos e glicerol também conhecidos como triacilglicerídeos e as ceras que são constituídas principalmente por ésteres originários de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa. Nos lipídios compostos, além do grupo éster outros grupamentos químicos também estão ligados ao ácido graxo. São representantes desta classe os fosfolípidios (ésteres formados a partir de ácidos graxos, glicerol e ácido fosfórico e outros grupos geralmente nitrogenados) e os glicolipídios (formados por ácidos graxos, grupo nitrogenado e um carboidrato). Os lipídios derivados são substâncias produzidas pela hidrólise ou decomposição dos lipídios neutros e compostos. São os ácidos graxos saturados e insaturados, o glicerol e os esteróis (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

O conteúdo lipídico das células das microalgas varia, em média, de 10% a 40% em termos de biomassa seca, porém, alguns estudos relatam um conteúdo de lipídios de mais de 85% para certas espécies de microalgas (LUQUE *et al.*, 2010; MAIRET *et al.*, 2011). Fatores como a nutrição, estágio de crescimento, temperatura, intensidade luminosa entre outros também influenciam no teor de lipídios da biomassa microalgal.

A maioria das microalgas tem como componente majoritário de seus óleos os triglicerídeos (fração conversível em biodiesel), superior a 80%, com o perfil de ácidos graxos preponderante de cadeias contendo de 16 a 18 átomos de carbono (LIU *et al.*, 2011; COUTO *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2013).

A composição típica dos ácidos graxos do óleo das microalgas é constituída principalmente dos ácidos graxos insaturados palmitoléico (16:1), oléico (18:1) e linoléico (18:2) e dos ácidos graxos saturados palmítico (16:0) e esteárico (18:0) (D'OCA *et al.*, 2011), que são potencialmente utilizados na produção de biodiesel (RAWAT *et al.*, 2013).

2.1.6.3.1 Biodiesel

A Resolução ANP n° 14 de 11/05/2012, define o biodiesel como sendo um combustível composto de álquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, produzido a partir de uma reação química entre óleos ou gorduras animais ou vegetais e um álcool, que pode ser metanol ou etanol (ANP, 2017).

O biodiesel pode ser classificado em três gerações, que diferem entre si por fatores como o tipo de matéria-prima e a tecnologia de processamento utilizada (Tabela 2.1). A primeira geração requer um processo simples de produção e compreende os fabricados a partir de espécies vegetais da agricultura comestíveis, como soja, milho, trigo e cana-de-açúcar (AHMAD *et al.*, 2011).

O biodiesel de segunda geração é produzido a partir de diferentes fontes de biomassa vegetal não comestível e resíduos agrícolas. A segunda geração compreende a conversão em biocombustível por meio de processos bioquímicos ou termoquímicos, de materiais como celulose e outras fibras vegetais existentes na madeira e em partes não comestíveis das plantas (KOH e GHAZI, 2011). Os combustíveis de terceira geração, também derivado de espécies não comestíveis, são baseados em avanços tecnológicos feitos na fonte. Esta geração inclui os combustíveis produzidos a partir de gorduras animais e da biomassa de microrganismos (WANG, 2013).

Tabela 2.1: Classificação do biodiesel de acordo com as diferentes fontes de óleos utilizados como matéria-prima para a produção

Biodiesel de 1° geração	Biodiesel de 2° geração	Biodiesel de 3° geração
Soja		Sebo bovino
Colza	Algodão	Gordura de aves
Milho	<i>Jatropha curcas</i>	Banha de porco
Arroz	Karanja (<i>Pongamia pinnata</i>)	Óleo de peixe
Girassol	Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>)	Bactérias
Cevada	Semente de tabaco	Fungos
Amendoim		Algas
Palma		Microalgas

Fonte: Adaptado de Atabani *et al.* (2012)

Dentre as matérias-primas disponíveis, a soja é a mais utilizada, responsável por mais de 82% da produção de biodiesel no Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), seguido da gordura bovina, com 16% (ANP, 2017). Além destes, com menores participações encontram-se o óleo de algodão, óleo de fritura, gordura de porco e de frango, óleo de palma, óleo de canola e outros materiais graxos (FERRARI *et al.*, 2005). Além das desvantagens relacionadas aos custos de produção (uso de grandes volumes de agrotóxicos e fertilizantes), a utilização da soja como matéria-prima para o biodiesel é um tema controverso, uma vez que a soja é um item importante na matriz alimentícia do Brasil e de outros países (NOGUEIRA, 2010; SCHENK *et al.*, 2008; STUART *et al.*, 2011).

Sob este aspecto, o biodiesel a partir de microalgas pode ser considerado altamente promissor, devido principalmente às seguintes vantagens (BRENNAN e OWENDE, 2010; HUANG, 2010):

- a) Além de não competirem com a agricultura, os cultivos de microalgas não requerem terras aráveis, podendo ser cultivada em região desértica e em solo degradado, uma vez que a demanda por terra é utilizada apenas como suporte para o sistema de cultivo;
- b) Embora cresçam em meio aquoso, as culturas de microalgas consomem menos água do que plantas terrestres e águas residuais podem ser reutilizadas no processo, reduzindo o consumo global de água doce; além disto, os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, as quais não podem ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos processos de produção (por exemplo: agropecuária, industrial e dejetos domésticos);

- c) Podem crescer bem em regiões com extremas condições climáticas, além disto, sua produção pode ser realizada durante todo o ano, não seguindo o regime de safras;
- d) O cultivo não requer a aplicação de herbicidas ou pesticidas;
- e) Têm um potencial de crescimento rápido, sendo capaz de dobrar sua biomassa em períodos curtos (3,5h);
- f) São eficientes fixadoras de carbono atmosférico, ou mesmo o residual de processos industriais, através da fotossíntese (cada tonelada de biomassa produzida consome 1,83 toneladas de CO₂, 10 – 20 vezes mais que o absorvido pelas plantas oleaginosas). Desta forma, o sequestro de carbono poderia impedir que o acúmulo de gases do efeito estufa fosse ainda maior;
- g) Mesmo com uma percentagem de lipídios menor comparada às demais oleaginosas (Tabela 2.2), esses microrganismos podem atingir uma produtividade até 30 vezes maior do que o óleo de soja. Além disso, os óleos de microalgas são muito similares aos óleos vegetais;
- h) Sua composição bioquímica pode ser modulada por diferentes condições de crescimento, sendo induzidas a produzirem altas concentrações de componentes de grande importância comercial e o rendimento de óleo pode ser significativamente melhorado.

Tabela 2.2: Comparação do teor de óleo, produtividade de óleo, área de produção e produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais com microalgas.

Matéria - prima	Teor de óleo (%)	Produtividade de óleo (L.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)	Área de produção (m ² .ano ⁻¹ .kg ⁻¹ de biodiesel)	Produtividade em biodiesel (kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Pinhão	28	741	15	656
Canola	41	1.190	12	862
Girassol	40	1.070	11	946
Mamona	48	1.307	9	1.156
Palma	36	5.366	2	4.747
	30	58.700	0,2	51.927
Microalgas	50	96.800	0,1	86.515
	70	136.900	0,1	121.104

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

Entre as inúmeras vantagens do biodiesel, estão as considerações ambientais: esse biocombustível é isento de contaminantes como o enxofre e, portanto, não há emissão de gases sulfídricos (gases que podem levar a problemas respiratórios); o biodiesel é originado dos ácidos graxos e não contém aromáticos, produtos presentes nas emissões da queima de óleo diesel mineral e amplamente conhecidos como cancerígenos. A combustão completa do biodiesel reduz os teores de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (CH) não queimados e material particulado (MP); possui baixa emissão de fuligem reduzindo em até 50% comparado ao diesel; e é biodegradável (RAMOS *et al.*, 2003; CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010). Com relação aos aspectos econômicos, pode diminuir a dependência dos países importadores de petróleo e estimular a produção agrícola e o desenvolvimento rural. No que diz respeito ao desempenho, o biodiesel apresenta maior ponto de fulgor, número de cetano e poder lubrificante. Por fim, pode ser usado em motores com ignição por compressão sem que haja a necessidade de modificações mecânicas (PINTO *et al.*, 2005; SUAREZ *et al.*, 2007; DEMIRBAS, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Entretanto, algumas propriedades físicas tais como alta viscosidade e baixa volatilidade, características que reduzem a eficiência de combustão, podendo provocar até o entupimento em algumas partes do motor (ONG *et al.*, 2011), poder calorífico, menor do que no diesel, degradação por oxidação com facilidade e tendência de formar cristais a baixas temperaturas (KNOTHE, 2005; KNOTHE, 2007) são fatores limitantes na utilização de biodiesel em motores a diesel e se caracterizam como desafios na cadeia produtiva de biodiesel.

2.1.6.3.2 Extração dos lipídios e potencialidade das microalgas para produção de biodiesel

A extração do óleo de microalgas é tida como uma etapa de elevada complexidade, pois os lipídios intracelulares estão presentes na membrana celular, sendo necessário realizar o rompimento da parede celular para maximizar a extração do material lipídico (MARTINEZ-GUERRA *et al.*, 2014). De acordo com Galadima e Muraza (2014), a extração do óleo das algas é um fator de extrema importância na produção de biodiesel.

A extração sofre influência das condições de cultivo e da recuperação da biomassa, onde tais procedimentos bem executados garantem além da redução do custo

de extração, um alto rendimento no volume de óleo extraído. A fim de reduzir a degradação dos lipídios, o método a ser selecionado para a extração do óleo de microalgas deve apresentar rapidez e ser termolábil. Vários métodos de rompimento celular podem ser utilizados para ruptura da parede celular, incluindo prensagem mecânica, homogeneização, extração com solvente, extração com fluido supercrítico, extração enzimática, extração por ultrassom e choque osmótico (CHISTI, 2007; SING *et al.*, 2010).

Na extração com solventes, o óleo de microalgas é extraído pela repetição de lavagens com solventes orgânicos, que pode ser feita de forma isolada ou juntamente com outros métodos, a fim de se obter melhor rendimento em óleo. Devido à solubilidade dos lipídios em solvente apolares, a seleção deste deve atender a alguns requisitos, como: possuir seletividade para separar o óleo de materiais indesejáveis; baixa toxicidade; fácil recuperação sem deixar resíduos no óleo; imiscibilidade em água; e apresentar ponto de ebulição que favoreça sua posterior eliminação (D'OCA *et al.*, 2011; KING *et al.*, 2002).

Folch e colaboradores (1957) desenvolveram um método de extração de lipídios usando uma mistura dos solventes clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 v/v, seguida pela adição de solução salina de KCl, visando uma melhor separação das fases lipídicas e aquosa. Bligh & Dyer (1959) modificaram o método anteriormente descrito e propuseram um método rápido para extração e purificação de lipídios totais utilizando os solventes clorofórmio, metanol e água na proporção 2:1:0,8 v/v. As extrações de lipídios por Folch e Bligh & Dyer são métodos de extração a frio para que a qualidade da fração lipídica não seja afetada.

Após a etapa de extração, os lipídios extraídos das microalgas podem ser transformados em biodiesel através de diferentes processos tais como craqueamento, hidrocraqueamento e transesterificação, sendo este último o mais conhecido e utilizado atualmente.

A transesterificação consiste numa reação catalítica de triacilgliceróis (TAG) de óleos ou gorduras (vegetal ou animal) com álcoois de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, formando ésteres (metílicos ou etílicos) de ácidos graxos, constituintes do biodiesel, e a glicerina como coproduto (Figura 2.4) (LÔBO *et al.*, 2009).

Estequiometricamente, a reação de transesterificação requer 3 mols de álcool para cada mol de triglicerídeo para produzir 1 mol de glicerol e 3 de ésteres. Industrialmente, por se tratar de processo reversível, são utilizados pelo menos 6 mols de álcool para

cada 1 mol de triglicerídeo. Para que a reação de fato aconteça, o primeiro passo é a conversão dos triacilgliceróis à diglicerídeos, em seguida, a conversão de diglicerídeos a monoglicerídeos e, por fim, monoglicerídeos se convertem em monoésteres alquílicos e glicerol (LAM e LEE, 2012). Dentre os vários tipos de catalisadores utilizados para a reação de transesterificação, os mais convencionalmente empregados são os catalisadores básicos tais como os hidróxidos e os alcóxidos de metais alcalinos e os catalisadores ácidos, sendo os principais os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e organossulfônicos (SUAREZ *et al.*, 2007).

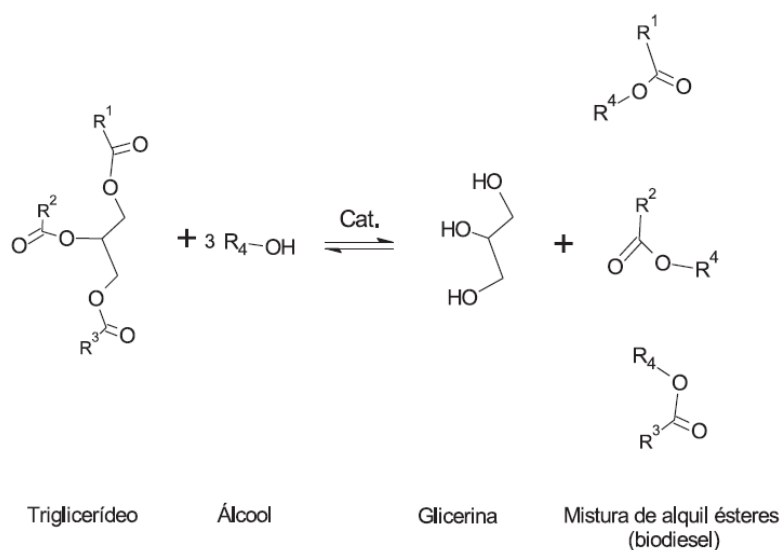


Figura 2.4: Reação de transesterificação de triglicerídeo
 Fonte: Lôbo *et al.* (2009)

Para o biodiesel produzido a partir de microalgas ser aceito tanto no mercado nacional quanto nos mercados internacionais, as suas propriedades físico-químicas devem estar dentro dos padrões nacionais, definidos pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP (ANP 14/2012), e internacionais como o International Biodiesel Standard (EN 14214) e o ASTM Biodiesel Standard. As propriedades do biodiesel são fortemente dependentes das características do ácido graxo que compõe a cadeia do triglicerídeo e que dá origem ao metil ou etil éster (KNOTHE, 2005).

Embora a saturação e o perfil dos ácidos graxos das microalgas não pareçam ter muito impacto sobre a obtenção de biodiesel a partir da reação de transesterificação, eles afetam as propriedades do combustível. Por exemplo, óleos saturados produzem um biodiesel com alta estabilidade oxidativa e alto número de cetanos, mas propriedades indesejáveis a baixas temperaturas, tais como a solidificação parcial e a perda de fluidez

do biodiesel (CARDOSO *et al.*, 2011; LÔBO *et al.*, 2009). Entretanto, ácidos graxos poliinsaturados são muito susceptíveis à oxidação, possuindo problemas de instabilidade quando armazenado por muito tempo (HU *et al.*, 2008; BUCY, 2012). Tal problema pode ser resolvido com a utilização de aditivos antioxidantes sintéticos que proporcionam maior estabilidade ao combustível; eles retardam o início da reação de oxidação, pois reagem com os radicais livres formando compostos estáveis e assim, dificultam a propagação das reações em cadeia.

Dessa forma, observa-se que tanto os ésteres graxos saturados quanto os insaturados possuem vantagens e desvantagens e o ideal é encontrar uma forma de balancear a composição do biodiesel para que apresentem um melhor desempenho.

A Tabela 2.3 compara as propriedades de biodiesel de primeira geração, biodiesel de microalgas e os principais padrões.

Tabela 2.3: Propriedades do biodiesel de 1ª geração, biodiesel a partir de microalgas e limites dos padrões estabelecidos ANP, EN 14214 e ASTM D6751.

Propriedades	Biodiesel de 1ª geração ^a	Biodiesel de microalgas ^b	ANP 14/2012 ^c	EN 14214 ^d	ASTM D6751 ^e
Densidade a 25°C (g.cm ⁻³)	0,86-0,89	0,864	0,85 - 0,9	0,86 -0,9	0,86 - 0,9
Viscosidade a 37,8°C (cSt)	3,6-9,48	5,2	3,0 - 6,0	3,5- 5,2	3,5- 5,0
Poder calorífico (MJ.kg ⁻¹)	31,8-42,3	41	-	-	-
Número de cetanos	45-65	-	-	>51	-
Índice de acidez mg (KOH g ⁻¹)	-	0,374	<0,5	<0,5	<0,5
Ponto de fulgor (°C)	100-170	115	>100	>101	>100

Fonte: Adaptado de Brennan e Owende, (2010)^a; Xu *et al.* (2006)^{b,e}; ANP (2008)^c; CEN (2009)^d.

Como observado na Tabela 2.3, as propriedades físico-químicas de biodiesel a partir das microalgas estão de acordo tanto com as normas padrão nacional quanto com os padrões internacionais (exceto pela viscosidade no padrão ASTM D6751).

Por constituir uma fonte de energia limpa a um custo competitivo, a utilização de microalgas para a produção de biodiesel tem recebido esforços concentrados em diversas pesquisas acadêmicas (XU *et al.*, 2006; MAKULLA *et al.*, 2000; YOO *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2012; ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014; HAKALIN *et al.*, 2014).

Xu *et al.* (2006) observaram o perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no biodiesel produzido a partir da microalga *Chlorella protothecoides* cultivada heterotroficamente em biorreatores. Os principais ácidos graxos encontrados foram o ácido oléico, ácido octadecadienóico, ácido octadecanóico, representando mais de 80% na composição do biodiesel. De acordo com o mesmo autor, este fato resulta em um biodiesel de alta qualidade. Makulla *et al.* (2000) verificaram concentrações de ácido palmítico (16:0) entre 35,86% e 43,06% na microalga *Scenedesmus obliquus*. YOO *et al.* (2010) também obtiveram concentrações majoritárias de 16:0 quando estudaram o perfil lipídico das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Botryococcus braunii*. Wu *et al.* (2012) cultivaram a microalga *Chlamydomonas* sp. em águas residuais industriais e verificaram acúmulo de lipídios de até 18,4% e teor de mais de 90% dos ácidos graxos 14:0, 16:0, 16:1, 18:1 e 18:3 na composição dos ácidos graxos totais. Teores da ordem de 97,5 %, 95 %, 89,5% e 83 % dos ácidos graxos C16 e C18 foram observados por Andruleviciute *et al.* (2014) nos óleos extraídos das microalgas *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Haematococcus* sp., e *Nannochloropsis* sp., respectivamente. Hakalin *et al.* (2014) reportaram que os ácidos graxos saturados e monoinsaturados compreendem mais de 80% dos ácidos graxos totais presentes no biodiesel a partir da microalga *Scenedesmus* sp., confirmando assim que a biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. poderia ser utilizada como matéria-prima adequada para a produção de biodiesel.

Na matriz energética do Brasil, o biodiesel foi incluído no ano de 2005 através do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel – PNPB – (Lei 11.097/2005), que autorizou a mistura de 2% de biodiesel no diesel mineral comercializado, nomeado de B2 (ANP, 2014).

Este percentual de mistura passou a ser obrigatório no país a partir de janeiro de 2008, sendo ampliado sucessivamente até atingir 5% em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei Nº 11.097 de 2005. Atualmente o diesel vendido nos postos pelo Brasil possui 8% de biodiesel e 92% de diesel (B8). Este incremento no uso do biodiesel foi estabelecido em março de 2017. Em novembro deste ano o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) estabeleceu que o percentual

de mistura de biodiesel no diesel deverá passar dos atuais 8% para 10% em março de 2018 – antecipando em um ano o que determina a Lei 13.263/2016.

Segundo ANP (2017), a expectativa da indústria é produzir 4,5 bilhões de litros no ano de 2017, ante os 3,8 bilhões produzidos em 2016, quando o país registrou uma redução na produção de 2,6% quando comparado com o ano de 2015. A produção estimada para 2017 corresponde a 62% da capacidade instalada de produção de biodiesel.

As microalgas apresentam-se como uma fonte renovável alternativa para produção de biodiesel com grande capacidade de suprir a demanda de combustíveis. Estima-se que no Brasil, seja necessária a produção de 29,5 milhões de toneladas de biodiesel para a substituição de todo o diesel utilizado em transporte por ano. Considerando a soja como matéria-prima, seria necessária a ampliação do cultivo em 63 milhões de hectares para atender esta necessidade, enquanto utilizando-se microalgas cultivadas em fotobiorreatores, poderia utilizar apenas 55 mil hectares para a mesma produção (HAKALIN, 2014; PÉREZ, 2007).

2.1.6.4 Bioprodutos a partir da biomassa residual de microalgas

A biomassa de microalgas é reconhecida como um estoque potencial de substâncias para a produção de biocombustíveis. Entretanto, após a extração de lipídios cerca de 70% da biomassa de microalgas permanece intacta (PARK *et al.*, 2012). Estima-se que são gerados aproximadamente 2,4 kg de resíduos para cada litro de biodiesel produzido a partir de microalgas (WARD *et al.*, 2015).

A utilização da biomassa residual é uma forma de maximizar a produção de energia obtida por meio das microalgas e reduzir os custos totais dos processos e de tratamento dos resíduos. Uma alternativa para a destinação da biomassa residual é a sua utilização como adsorvente alternativo para a remoção de corantes de águas residuais industriais.

2.1.6.4.1 Processo de Adsorção com biossorvente

A adsorção é uma tecnologia promissora e amplamente adotada para tratamento de efluentes industriais, responsável pela remoção de poluentes orgânicos, corantes e compostos tóxicos (DOS SANTOS *et al.*, 2015, GOMES *et al.*, 2016, PUCHANA-ROSETO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2016; PICCIN *et al.*, 2016).

A adsorção é um fenômeno físico ou químico baseado no princípio de que uma superfície sólida (material adsorvente) quando em contato com um fluido (líquido ou gás), tende a reter e acumular uma camada superficial de moléculas de soluto (material removido da fase fluida), fato que ocorre devido à ação de forças de superfícies não balanceadas (PICCIN, 2013).

O carvão ativado é o adsorvente mais utilizado para a remoção de corantes devido a sua alta capacidade de adsorção e efetiva remoção. No entanto, o seu uso como adsorvente é desvantajoso, pois estes são derivados de fontes não renováveis (TSENG *et al.*, 2006) e são relativamente caros. Por esta razão, um número de materiais não convencionais de baixo custo foram recentemente testados e propostos como adsorventes alternativos ao carvão ativado para a remoção de corantes (DERMIRBAS, 2008). Estes materiais compreendem resíduos da indústria coureira (PICCIN *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2016; MELLA *et al.*, 2017); resíduos agroindustriais (DUTTA *et al.*, 2011; SIDIRAS *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2012); biomassa fúngica (KAUSHIK *et al.*, 2009; PUCHANA-ROSETO *et al.*, 2016) e algas (DANESHVAR *et al.*, 2012; KOUSHA *et al.*, 2012; CHANDRA *et al.*, 2015).

Uma utilização econômica adequada da biomassa de algas desengordurada (*Defatted Algal Biomass - DAB*) é a sua aplicação como adsorvente para a remoção de metais pesados e corantes de águas residuais industriais. A parede celular das microalgas é composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e lipídios que oferecem grupos funcionais para se ligarem com os poluentes, tais como grupos carboxilas e hidroxilas que desempenham um papel importante no sistema de adsorção (CHANDRA *et al.*, 2015).

Cardoso *et al.* (2012) compararam a utilização da biomassa da microalga *Spirulina platensis* (SP) e do carvão ativado comercial (CA) como adsorventes para remoção do corante têxtil Vermelho Reativo 120 (RR-120) de efluentes aquosos. Capacidades de adsorção máxima de 482,2 e 267,2 mg.g⁻¹ foram encontradas a pH 2 e 25 °C, para os adsorventes SP e CA, respectivamente. Os adsorventes de SP e CA apresentaram bom desempenho para o tratamento de efluentes têxteis industriais sintéticos, removendo entre 94,4 - 99,0% e 93,6 - 97,7%, respectivamente, das misturas de corantes contendo altas concentrações salinas.

Kousha *et al.* (2013) avaliaram os efeitos dos parâmetros concentração inicial de corante (mg.L⁻¹), pH inicial da solução, quantidade de microalgas (mg.L⁻¹) e tempo de contato (min) na biossorção do corante verde de malaquita (MG) pela biomassa das

microalgas *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella vulgaris*. A eficiência máxima de remoção do corante foi de 73,49 e 91,61% para a biomassa da *S. quadricauda* e *C. vulgaris*, respectivamente. A análise FT-IR indicou que grupos carboxilas presentes na biomassa das microalgas foram responsáveis pela adsorção do corante MG. A biossorção do corante MG na biomassa das microalgas seguiu o modelo cinético de pseudo-segunda ordem, e o processo de biossorção foi considerado viável, endotérmico e espontâneo.

2.2 Tratamento de efluentes com microalgas interligado com a produção de biocombustíveis

A crescente concentração populacional urbana e o desenvolvimento das atividades industriais e agropecuárias nos últimos tempos vêm gerando cada vez mais elevados volumes de efluentes que devem ser devidamente tratados, promovendo a redução dos compostos presentes, tornando-os seguros à saúde e ao ambiente (ASLAN e KAPDAN 2006; XIN, *et al.*, 2010).

Os tratamentos convencionais de efluentes além de envolverem altos custos podem ser ineficientes para a remoção de compostos específicos, assim, é crescente a busca por alternativas e novos processos que visem o tratamento adequado dos efluentes para posterior descarte. Uma alternativa idealizada seria uma combinação entre o tratamento de águas residuais e a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, agregando valor ao processo final (QUEIROZ *et al.*, 2011).

A utilização de microalgas no processo de tratamento de águas residuais foi inicialmente proposta por Oswald e Gotaas (1957), mas ganhou impulso a partir da década de 80 (PROULX e DE LA NÖUE, 1988; OSWALD, 1988; CHEVALIER e DE LA NÖUE, 1985). As microalgas têm aplicação potencial para ser utilizadas como alternativa no tratamento de efluentes para a redução de matéria orgânica, DQO, DBO e eliminação de nutrientes tais como nitrogênio e fósforo, bem como na desinfecção (remoção de coliformes) e na remoção de metais pesados (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

Estudos também mencionam a utilização destes organismos na remoção de compostos orgânicos tóxicos, como fenóis e clorofenóis (HIROOKA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004). As microalgas também foram relatadas por utilizarem vários compostos, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos, disruptores endócrinos e cianetos como fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, a parede celular microalgal é

composta de estruturas de carboidratos capazes de biossorbir agentes químicos tóxicos em águas residuais (HAMMED *et al.*, 2016).

As microalgas possuem rotas metabólicas que se adequam às formas de nitrogênio disponíveis no meio, a fim de promover a assimilação e fixação deste. Durante a assimilação da fonte de nitrogênio, verifica-se que o nitrogênio amoniacal é a forma preferida das microalgas devido à ausência de uma reação redox na sua assimilação, o que para a célula é benéfico porque ocorre uma economia de energia. Assim as outras formas de nitrogênio só são consumidas no meio de cultivo quando não há mais a presença do nitrogênio amoniacal no meio (CAI *et al.*, 2013). O nitrogênio amoniacal não só é removido pelo metabolismo celular, mas também pelo processo de *air stripping*, onde quantidades significativas de amônia podem ser volatilizadas a pH e temperatura elevados (GARCIA *et al.*, 2000).

O fósforo, como o nitrogênio, é um macronutriente que desempenha um papel vital na célula, visto que este é usado para formar componentes estruturais e funcionais para o bom crescimento, desenvolvimento e manutenção celular da microalga (CAREY *et al.*, 2013). O fósforo é preferencialmente assimilado na forma inorgânica como fosfatos, porém algumas espécies são capazes de usar o fósforo encontrado em ésteres orgânicos para o crescimento. Semelhante à remoção de nitrogênio, a remoção de fósforo em águas residuais não se dá apenas pela captação para a célula, mas também por condições externas como pH e oxigênio dissolvido. O fósforo não pode existir no estado gasoso, porém o fosfato precipitará no meio como resultado do pH elevado e da concentração elevada do oxigênio dissolvido (CAI *et al.*, 2013).

Quando comparado com o tratamento convencional de águas residuais (tratamento biológico aeróbio), em que um floco biológico degrada a matéria orgânica carbonácea até CO₂, as microalgas podem assimilar poluentes orgânicos em componentes celulares como lipídios e carboidratos, alcançando assim redução de poluentes sem gerar danos ao ambiente (WANG *et al.*, 2010).

Diversas variáveis podem influenciar diretamente no crescimento eficaz das microalgas em águas residuais, tais como o pH, a temperatura, a concentração de nutrientes essenciais, incluindo nitrogênio, fósforo e carbono (e as relações destes constituintes), e a disponibilidade de luz, O₂ e CO₂. A presença de metais como cádmio e ou mercúrio, produtos químicos e orgânicos, bem como a presença de bactérias patogênicas ou predatórias nos efluentes industriais podem impactar negativamente o crescimento de algas (PITTMAN *et al.*, 2011).

Muitos estudos (vide Tabela 2.4) têm demonstrado êxito na utilização de culturas de algas para tratar diferentes tipos de águas residuais (LI *et al.*, 2011a, b; WANG *et al.*, 2010a; WOERTZ, *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2013; MARTÍNEZ *et al.*, 2000).

Altas remoções de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) foram observados por Jia *et al.* (2016) quando cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em diferentes diluições de efluente anaeróbio digerido (*Digested Anaerobic Wastewater - ADWW*). Neste estudo foram verificadas percentagens de remoções de NT entre 78,71% e 91,28% e de PT entre 53,05% e 88,72%.

Wang *et al.* (2010) utilizaram efluente biodigerido da indústria de laticínios nas diluições de 10x, 15x, 20x e 25x como meio de cultivo para o crescimento da microalga *Chlorella* sp. e verificaram altas remoções de NH₃-N em todas as diluições, chegando a 100%, máxima remoção de fósforo de 74,7%) na cultura mais diluída (25x) e máxima remoção de DQO (38,4%) na cultura mais concentrada (10x).

Zhu *et al.* (2013) cultivaram *Chlorella zofingiensis* em águas residuais providas da criação de porcos, em seis diferentes concentrações iniciais de demanda química de oxigênio. Percentagens de redução de DQO (65,81% - 79,84%), e remoções de NT (68,96% - 82,70%) e PT (89,23% - 100%) foram alcançadas neste estudo.

Li *et al.* (2011a) em experimentos cultivaram a microalga *Chlorella* sp. em reator circular em escala de bancada contendo esgoto filtrado, em operação contínua com colheita diária e taxa de reposição de 50% e observou a produtividade de 0,92 g de microalga.L⁻¹.dia⁻¹. Ainda neste experimento observou-se remoção de 93,9% de amônia, 89,1% de nitrogênio total, 80,1% de fósforo total e 90,8% de DQO. Remoção de nitrogênio e fósforo no tratamento terciário de esgoto foi estudada por Martínez *et al.* (2000) utilizando *Scenedesmus obliquus* eliminando 100% de amônia e 98% de fósforo. Abdel-Raouf *et al.* (2012) afirmaram que o cultivo de microalgas em sistemas de tratamento de esgoto inibiu coliformes e remove metais pesados.

Tabela 2.4: Remoção de nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, fósforo, DBO e DQO nos cultivos de microalgas em diferentes tipos de efluentes.

Microalga	Tipo de efluente	Tipo de tratamento	Remoção (%)					Referências
			Nitrogênio total	Nitrogênio amoniacal	Fósforo	DBO	DQO	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Sintético de cervejaria	-	20,8	-	-	-	57,5	Mata <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial da fabricação do ácido cítrico		94,4	100	90,6	95,7	94,9	Li <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Efluente municipal	Após tratamento primário		93,6%	66,2		77,3	Sacristán de Alva <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Efluente municipal	Após tratamento com lodo ativado		92,4	64,3		48,2	Sacristán de Alva <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Efluente municipal	Enriquecido com meio		71,1	10,6		36,5	Sacristán de Alva <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella</i> sp.	Efluente municipal secundário	Filtração (0,2 µm)	92		86			Cho <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella</i> sp.	Efluente municipal secundário	Filtração (0,1 µm)	85		84			Cho <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella</i> sp.	Efluente municipal secundário	Radiação UV (3 min)	75		84			Cho <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente municipal	Tratamento primário		96	77			Batista <i>et al.</i> (2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente municipal	Tratamento primário		98	100		54	Batista <i>et al.</i> (2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente sintético	Autoclavagem		99	95		59	Yujie <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial de laticínio biodigerido	Filtrado (0,15 µm)	78,3	100	71,6		34,5	Wang <i>et al.</i> (2010)

De acordo com Tam *et al.* (1998), o mecanismo de remoção de metais pesados resulta da carga elétrica negativa presente nas superfícies das microalgas e, portanto, uma afinidade para os metais pesados, que se apresentam normalmente como cátions.

As microalgas demonstraram capacidade para produzir enzimas capazes de degradar hidrocarbonetos (CHEKROUN *et al.*, 2014). Estudos anteriores sobre remediação de ambientes poluídos por hidrocarbonetos com microalgas provaram que várias espécies são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono (SEMPLE *et al.*, 1999).

A potencialidade das microalgas para o tratamento de águas residuais e obtenção de biocombustíveis tem sido estudada por diversos autores (GOUVEIA *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2015)

No contexto da produção de biocombustíveis, os estudos buscam a viabilidade econômica dos cultivos visando a utilização de águas residuais como fonte de nutrientes para as microalgas em substituição aos meios de cultivos sintéticos.

A produção de biomassa microalgácea para biocombustíveis é uma alternativa promissora, e a utilização de águas residuais é uma estratégia para a redução de custos dos combustíveis de microalgas, pois os nutrientes e a água doce contribuem cerca de 50% do custo total de produção de biomassa (SING e DAS, 2014).

Shen *et al.* (2015) investigaram a combinação do tratamento terciário de águas residuais urbanas e a produtividade de biomassa e lipídios. Neste estudo observou-se produtividade máxima de biomassa de $577,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e produtividade média de lipídios de $16,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Ma *et al.* (2016) cultivaram a *Chlorella vulgaris* em esgoto sintético suplementado com glicerol pré-tratado proveniente da produção de biodiesel e verificaram que a adição de 10 g.L^{-1} desse resíduo promoveu a redução de 95% do nitrogênio total do efluente, a produção de biomassa e o acúmulo lipídico.

Gouveia *et al.* (2016) cultivaram as microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e um consórcio de microalgas em efluente urbano em fotobiorreatores de 150 litros. Os autores evidenciaram elevada remoção dos nutrientes: nitrogênio, fósforo e DQO e máxima produtividade e teor de lipídios de $900 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 13,6%, respectivamente. A Tabela 2.5 apresenta a biomassa produzida em (g.L^{-1}), o conteúdo lipídico (%) e o período de cultura de diferentes espécies de microalgas cultivadas em efluentes.

Tabela 2.5: Biomassa produzida e conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas cultivadas em efluentes.

Microalga	Tipo de efluente	Biomassa produzida (g.L ⁻¹)	Conteúdo lipídico (%)	Período de cultura (dias)	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	Industrial de cervejaria	2,28 ± 0,09	22 ± 0,02	10	Farooq <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial de cervejaria	2,01 ± 0,02	20 ± 0,05	10	Farooq <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Efluente municipal	0,77 - 1,18	12,7 – 28,3	21	Sacristán <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Efluente municipal	0,6	12,06	10	McGinn <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella</i> sp.	Efluente municipal secundário	0,41 – 0,67	15 - 31	9	Cho <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial da suinocultura pré-tratado	0,2 -1,14	7 - 29	30	Ji <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente municipal terciário	0,29	30	7	Ji <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente municipal terciário	0,31	27	7	Ji <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente sintético	1,7	33	17	Yujie <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial de laticínio biodigerido	1,47 - 1,71	9 – 13,7	21	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente municipal	1,46	36,26	30	Zhang <i>et al.</i> (2014)

2.3 Efluentes de curtumes

A indústria do couro caracteriza-se por consumir grande quantidade de água nos processos devido às operações realizadas para transformar as peles em couros utilizarem água como um veículo para a difusão de produtos químicos e para extração de materiais indesejáveis. Uma média de 35 - 40 m³ de águas residuais são produzidas por tonelada de pele salgada (cerca de 630 litros de água por pele) (SHUQING *et al.*, 2010). Segundo Rajamani *et al.* (2008), o processamento médio de couros no mundo é de 50.000 ton.dia⁻¹ e a descarga do efluente é superior a 150 milhões L.dia⁻¹.

Os efluentes de curtume apresentam grande quantidade de material putrescível (proteínas, sangue e fibras musculares), elevadas demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), altas concentrações de impurezas inorgânicas (sais amoniacais, sulfetos e cloretos), sólidos suspensos e dissolvidos, e outros poluentes específicos tais como taninos vegetais e/ou sintéticos, óleos sulfitados e sulfatados, cromo e surfactantes (GUTTERRES *et al.*, 2015).

Para Font (1985) é grande o volume da água residual de remolho, com elevada concentração de cloreto de sódio, presença de gorduras, sangue, proteínas solúveis, surfactantes, biocidas e impurezas da pele. De 15% (v/v) a 40% (v/v) de sal (NaCl) é usado para conservação das peles e é removido durante a etapa de remolho (SUNDARAPANDIYAN *et al.*, 2010).

Poluentes orgânicos (componentes proteicos e lipídicos) são originados a partir das peles (calcula-se que a pele crua tem 30% de perda do material orgânico durante o processamento) ou são introduzidos durante o processamento da pele (por exemplo, taninos). Poluentes inorgânicos são remanescentes dos produtos químicos utilizados que não foram fixados na pele (CASSANO, 2001; LOFRANO *et al.*, 2013).

De acordo com estudo realizado por Baur (2012), 31% do nitrogênio total está na forma de nitrogênio amoniacal no processamento de peles, portanto, considerando que um curtume completo contribui com aproximadamente 6,45 g de NTK por quilo de pele processada, a contribuição de nitrogênio amoniacal fica em torno de 2,02 g de N-NH₃ por quilograma de pele processada. Wang *et al.* 2012 relataram que a poluição do nitrogênio total (NT) produzido a partir da etapa de ribeira é principalmente composto de nitrogênio orgânico (NO, representando 60% de NT) e nitrogênio amoniacal (NH₃-

N, representando 40% de NT). Nitratos e nitritos são insignificantes devido ao seu conteúdo extremamente baixo.

A qualidade dos efluentes de curtume varia de uma planta para outra (Tabela 2.6) e será influenciada pelo tipo de curtimento, pelos tipos de produtos químicos utilizados e pelos processos de produção empregados (GUTTERRES *et al.*, 2015; LETA *et al.*, 2004; SZPYRKOWICZ *et al.*, 2005; GANESH *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2007; DEEPALI *et al.*, 2009; HAYDAR e AZIZ, 2009). Além disso, é relatado que variações nas mesmas condições de fabricação podem ocorrer devido à qualidade das peles brutas processadas (KURT *et al.*, 2007).

Tabela 2.6: Características físico-químicas de águas residuais de curtumes

Parâmetros*	Gutterres <i>et al.</i> (2015)	Munz <i>et al.</i> (2008)	Apaydin <i>et al.</i> (2009)	Haydar and Aziz (2009a)	Mandal <i>et al.</i> (2010)
pH	4,79 – 8,99	5,8 – 7,5	7,4	7-10	7,9-9,2
SDT	8109 - 40106	-	-	4466- 14572	21620
SST	1591 - 3325	160-1840	2690	568 - 2132	1244
DQO	3884 - 8523	1280-5680	3700	1760 - 3320	2533
DBO ₅	1769 - 4073	6300-12100	1470	390 - 1320	977
N-NH ₃	185 - 762	102-324	180	-	118
Fósforo	15 - 83	-	-	-	62
Cromo	44 - 212	-	-	23-122	258
Sulfito	-	3 - 80	440	-	860
Cloretos	2979 - 10011	3690 - 7410	-	-	6528

SST: Sólidos suspensos totais; SDT: Sólidos dissolvidos totais; N-NH₃: Nitrogênio amoniacal; DQO: Demanda Química de oxigênio; DBO₅: Demanda bioquímica de oxigênio;

*Todos os parâmetros são expressos em mg.L⁻¹, exeto o pH.

Com base nas suas características específicas, as águas residuais de curtumes são tratadas utilizando tecnologias apropriadas. De um modo geral, os efluentes tratados em curtumes apresentam as seguintes configurações em suas estações de tratamento de efluentes: tratamento preliminar, tratamento primário (ou físico-químico) e tratamento secundário (ou biológico), em alguns casos emprega-se também o tratamento terciário (ou de polimento). De acordo com Mella *et al.* (2012) alguns banhos do processamento do couro podem ser tratados separadamente e reciclados ao processo.

A seguir será apresentada uma breve descrição das etapas do tratamento de efluente de curtume baseada no trabalho de Aquim (2009), Mella (2012) e Gutterres (2015).

Tratamento preliminar

É a primeira etapa do tratamento cuja finalidade é a remoção de sólidos grosseiros e gorduras, a fim de que estes não danifiquem o sistema de bombas e não causem obstruções em tubulações nas etapas posteriores. Os mecanismos básicos de remoção são de ordem física e incluem: gradeamento, remoção de óleos e gorduras, desarenação e peneiramento.

Tratamento primário ou tratamento físico-químico

O tratamento primário contempla etapas de homogeneização e neutralização do efluente, cuja finalidade é facilitar o tratamento posterior, evitando as variações nas características do efluente ao longo do tratamento. Após as etapas iniciais, o efluente é encaminhado para o processo de coagulação/floculação onde são adicionados coagulantes químicos, tais como sulfato de alumínio e cloreto férrico, que interagem com as partículas coloidais ou em suspensão, promovendo a desestabilização das mesmas e posterior formação de flocos que irão sedimentar com maior facilidade. A parte sedimentável (lodo) é separada do efluente clarificado em taques de sedimentação (decantador primário). Nos curtumes que segregam as correntes que contém cromo, é realizada a precipitação do cromo com o objetivo de retirar o tal composto sob a forma de precipitado para reuso no processo de curtimento ou para que seja destinado a aterros de resíduos industriais perigosos (ARIP). A parte aquosa é encaminhada para o tanque de homogeneização para posterior tratamento.

Tratamento secundário ou tratamento biológico

Os processos de tratamento biológico visam à remoção da matéria orgânica e alguns nutrientes (compostos biodegradáveis). Entre os tratamentos biológicos, o mais utilizado é o tratamento com lodos ativados, que consiste em um método de tratamento aeróbio no qual é usado um consórcio microbiano que realiza a biodegradação dos poluentes mediante processos enzimáticos. O sistema consiste em um tanque com aeração que funciona como um reator biológico, seguido por um tanque de sedimentação (decantador secundário) e uma bomba que realiza a reciclagem parcial do lodo ativado no tanque biológico para aumentar a massa microbiana e mantê-la viva. O excesso de biomassa produzida é removido no decantador secundário.

Tratamento terciário ou polimento

A utilização do tratamento terciário em curtumes, na prática, não é comum. No entanto, existem diversos estudos com respeito à aplicação de tratamentos terciários visando remoção de determinados grupos de substâncias que não são removidas nos sistemas de tratamento convencionais (primário e secundário) ou na de remoção de poluentes que não tenham atingido os padrões de emissão do efluente. Dentre essas substâncias podem-se citar alguns íons (cloretos, sódio e cálcio), ou substâncias como corantes dissolvidos e complexos orgânicos. Além disso, o sistema terciário também é aplicado na eliminação de microrganismos indesejáveis, como organismos patogênicos, coliformes, etc.

2.4 Processamento do couro

As peles, matérias-primas da indústria do couro, constituem cerca de 7% em peso do corpo animal e geralmente são cobertas por pelos ou lã. Além de revestir o corpo dos animais superiores, as peles desempenham inúmeras funções, tais como, regular e manter constante a temperatura corporal, proteger frente à umidade e ao frio, eliminar produtos do metabolismo, armazenar substâncias graxas e exercer ação protetora contra a ação de bactérias e demais agentes agressivos do meio em que vive o animal. A pele é formada basicamente por três camadas distintas, cada qual com a sua função e constituição química (GUTTERRES, 2008).

Os curtumes objetivam a transformação da pele crua, um material altamente putrescível, em couro, um produto estável, com um valor comercial significativo. O processo de fabricação do couro é feito mediante uma série de etapas que intercalam operações unitárias, processos químicos e mecânicos. As etapas do processo, que envolvem tratamentos químicos das peles em banhos, para sua limpeza ou para condicionamento de suas fibras, bem como etapas intermediárias de lavagem com água, são realizadas em equipamentos conhecidos como fulões, que são grandes recipientes cilíndricos, normalmente de madeira, dotados de dispositivos para rotação em torno de seu eixo horizontal, com porta na superfície lateral para carga e descarga das peles, e dispositivos para adição dos produtos químicos. Existem três grandes grupos de etapas necessários para a transformação da pele em couro acabado: ribeira, curtimento, acabamento. Entretanto, para cada produto final desejado, o processamento do couro é

diferente e o tipo e quantidade de resíduos produzidos podem variar numa ampla gama (AQUIM, 2004; SOUZA, 2010).

A Figura 2.5 apresenta um fluxograma do processamento típico do couro e a indicação dos pontos de geração de resíduos líquidos, sólidos e gasosos.

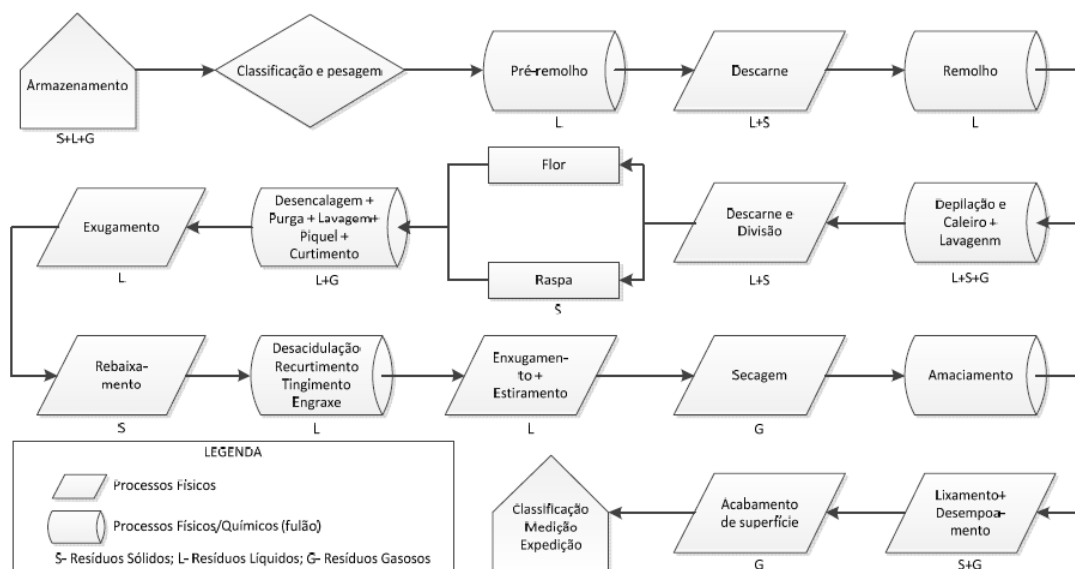


Figura 2.5: Fluxograma do processamento do couro
Fonte: Piccin (2013).

Em seguida, é apresentada uma breve explicação sobre cada uma das principais etapas envolvidas na transformação das peles cruas (frescas, *in natura* ou verdes) em couro acabado. Estas informações, amplamente difundidas na indústria coureira, estão baseadas em literatura específica deste setor produtivo, descritas por Gutterres (2008), Gutterres e Mella, (2014), Aquim (2009) e Mella (2013).

A etapa de ribeira tem por finalidade efetuar a limpeza na pele e preparar sua matriz de fibras colagênicas (estrutura protéica a ser mantida), para reagir adequadamente com os produtos químicos das etapas seguintes, de curtimento e acabamento molhado. Nas operações de ribeira há um grande consumo de água e produtos químicos, utilizados principalmente, na eliminação dos constituintes da pele que não constituem o produto final. As características das principais etapas são descritas a seguir.

a) **Conservação:** tem por finalidade interromper a decomposição da pele até o início do processamento. Essa operação visa criar condições que impossibilitam o desenvolvimento de bactérias e a ação enzimática. A salga com cloreto de sódio (NaCl) é o processo de conservação mais empregado. A desvantagem de sua utilização consiste

na alta quantidade empregada que deverá ser eliminada durante o processamento, gerando um efluente com alta concentração de sódio.

b) Pré-remolho: visa a lavagem do sal e a hidratação parcial das peles.

c) Pré-descarne: é realizado em uma máquina de descarnar que tem por objetivo a eliminação dos materiais aderidos ao carnal como a gordura.

d) Remolho: busca repor o teor de água das peles, limpá-las, remover impurezas aderidas aos pelos, extrair proteínas e materiais interfibrilares. Nesta etapa produtos como: sais, álcalis, ácidos, tensoativos e enzimas são utilizados no processo como auxiliares.

e) Depilação e caleiro: na depilação, a camada epidérmica da pele é retirada juntamente com pelo ou lã e demais materiais queratinosos. Já a etapa de caleiro é responsável pela abertura, intumescimento da estrutura fibrosa e ação sobre as gorduras, preparando a pele para o curtimento. Isto é conseguido com a utilização de cal hidratada e sulfeto de sódio.

f) Descarne e divisão: o descarne é realizado em máquina de descarnar e tem por objetivo a remoção física dos materiais aderidos ao tecido subcutâneo e adiposo, a fim de facilitar a penetração dos produtos químicos aplicados em etapas posteriores. A divisão consiste em separar as peles em duas partes: flor ou camada superficial, que constituirá o couro, e a raspa (apara) que compreende a camada inferior da pele.

g) Desencalagem: removem as substâncias alcalinas depositadas na pele nos processos anteriores. Sais amoniacais, bissulfito de sódio ou ácidos fracos são utilizados como desencalantes.

h) Purga: busca promover a limpeza da estrutura fibrosa por meio da ação de enzimas proteolíticas.

i) Píquel: constitui a última etapa de ribeira, tem por objetivo interromper a ação da purga e preparar as fibras colagênicas para uma fácil penetração dos agentes curtentes.

Após as operações de ribeira, a pele apresenta-se preparada para receber o agente curtente. Na etapa do curtimento, ocorre a verdadeira transformação das peles, pré-tratadas na ribeira, em material imputrescível, dotado de estabilidade química, térmica e mecânica. Quimicamente, o curtimento ocorre no interior das fibras promovendo o *crosslink* entre as moléculas de colágeno. A reticulação das cadeias do colágeno por ação dos agentes curtentes confere características importantes ao couro, como aumento na temperatura de retração, aumento da espessura do couro e resistência ao ataque de

microrganismos e enzimas. No processo de curtimento podem ser utilizadas substâncias de origem orgânica (taninos vegetais, sintéticos e aldeídos) ou inorgânica (sais de cromo, zircônio, alumínio e ferro). Dentre os inorgânicos, os sais de cromo trivalente são os mais utilizados, sendo o sulfato básico de cromo ($\text{Cr}_2(\text{OH})_2(\text{SO}_4)_2$) a forma mais comumente empregada.

Após a etapa de curtimento, o couro passa por um equipamento que promove a remoção do excesso de água dos couros. Seguido do enxugamento, o couro é rebaixado a fim de uniformizar a espessura do couro.

Posteriormente estas etapas, o couro está pronto para ser finalizado com as etapas de acabamento. O acabamento pode ser subdividido nas seguintes etapas: acabamento molhado, pré-acabamento e acabamento final.

O acabamento molhado compreende uma série de etapas, onde os couros são tratados com diversos tipos de produtos químicos, buscando-se nestas operações definir algumas propriedades físicas e mecânicas desejáveis no couro como, resistência à tração, maciez, elasticidade, enchimento, toque, firmeza, cor, lisura da flor e impermeabilidade. As etapas que compreendem o acabamento molhado são:

a) Desacidulação: é a etapa de eliminação dos ácidos livres existentes nos couros para que haja compatibilidade entre a carga do substrato (couro) e os produtos de caráter aniônicos, como recurtentes, corantes e agentes de engraxe. Os agentes de neutralização podem ser sais de ácidos fracos (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e borato de sódio), agentes complexantes (polifosfatos, acetatos, formiatos) ou sais de tanino sintético (na forma de sais de amônio ou de sódio).

b) Recurtimento: é o processo que visa completar o curtimento e dar as características finais ao couro. Nesta operação são definidas as principais características do artigo final com melhora de algumas propriedades mecânicas, de enchimento, textura e maciez. Pode ser realizado com recurtentes minerais (sais de cromo, alumínio e zircônio), recurtentes vegetais (tanino de mimosa, tanino de quebracho e o tanino do castanheiro) ou recurtentes poliméricos e aldeídos.

c) Tingimento: nesta etapa são empregados corantes e auxiliares de dispersão a fim de melhorar o aspecto e conferir uma determinada coloração ao couro.

d) Engraxe: a sua principal finalidade é conferir maciez ao couro. Nesta etapa as fibras são lubrificadas com materiais de engraxe, evitando a aglutinação das mesmas durante o processo de secagem; garantindo boa resistência mecânica, elasticidade e flexibilidade do couro.

A secagem e o pré-acabamento compreendem as operações físico-mecânicas de estiramento, secagem, aplicação de stucco, lixamento, desempoamento e amaciamento do couro.

No acabamento final são aplicados sobre a superfície do couro camadas de prontos pigmentados e filmogênicos, seguidas de prensagens que conferem o seu aspecto definitivo. Após o processamento, o couro é medido para ser comercializado.

Capítulo 3

Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp.

Artigo publicado no periódico: *Process Safety and Environmental Protection* (PSEP)

Volume 111, páginas 355-362

Disponível *online* desde 02 Agosto de 2017

DOI: 10.1016/j.psep.2017.07.024

Neste artigo foi realizado um planejamento experimental utilizando um delineamento composto central 2^2 (DCC) a fim de verificar a influência da intensidade luminosa e da concentração do efluente de curtume na produção da biomassa da *Scenedesmus* sp., bem como na remoção de poluentes tais como nitrogênio amoniacal, fósforo e demanda química de oxigênio pela microalga. A microalga foi cultivada em efluente bruto de curtume sem tratamento prévio coletado diretamente da etapa de ribeira sob diferentes concentrações (entre 20% e 100%) e intensidade luminosa (entre 80 e 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com temperatura de 25 °C e aeração constantes.

Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp.

J. T. DA FONTOURA¹, G. S. ROLIM¹, M. FARENZENA² and M. GUTTERRES¹

¹Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO),

²Laboratory of Process Control and Integration (LACIP), Chemical Engineering Post-graduated Program (PPGEQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av.

Luiz Englert s/n°, Porto Alegre-RS, Brazil, 90040-040, (51)3308-3954,

jutolfo@enq.ufrgs.br, mariliz@enq.ufrgs.br

Abstract: Due to the absorption capacity of nutrients by microalgae, their uses for industrial wastewater treatment have shown increasing interest in research. Tannery wastewaters have high organic content and are rich in nitrogenous compounds which are essential for microalgae cultivation. Thus, the aim of this study was to use tannery wastewater as alternative cultivation medium for microalgae biomass production aiming to treat this effluent. Biomass production and removal of ammoniacal nitrogen, phosphorus and chemical oxygen demand by the microalgae *Scenedesmus* sp., cultivated in tannery wastewater, was studied under different wastewater concentrations (between 20% and 100%), light intensity (between 80 and 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) at temperature of 25 °C and constant aeration. The results showed that the adaptation of microalgae for this nutrient source was effective. The cultivation of *Scenedesmus* sp. showed maximum biomass concentration (0.90 g.L^{-1}) and maximum removal of ammoniacal nitrogen (85.63%), phosphorus (96.78%) and COD (80.33%) at a tannery wastewater of 88.4% and light intensity of 182.5 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Keywords: Tannery wastewater, Microalgae, Ammoniacal nitrogen, Phosphorus, *Scenedesmus* sp.

3.1 Introduction

Leather production is a wide common industry all over the world and the tanning of hide is an important economic activity to bring forth wet-blue leather, a commodity in the market for the manufactory industry of leather goods. Tannery wastewaters are characterized by high concentrations of chlorides, organic matter (COD, BOD, TOC), organic and inorganic nitrogen. Furthermore, are present dyes, surfactants, sulfides, chrome, phenols, surfactants and pesticides (Gallego-Molina et al. 2013). Wastewater from tanneries contain large amounts of ammoniacal nitrogen N-NH_3 (getting at 762 mg.L^{-1}) due to the removal of non-collagenous proteins of raw hide on beamhouse process and addition of ammonium salts in the delimiting and purged stage (Aquim et al., 2010; Gutterres et al., 2015). This mixture of many compounds may

complicate the wastewater treatment. In addition, for the many leather articles and leather goods, the process in tanneries and chemicals used are different, and the kind and amount of wastewater vary over a wide range.

Various techniques of treatment have been studied for their applicability to tannery wastewater. Among them, chemical coagulation (Achouri et al., 2017), photodegradation (Sun et al., 2006) biodegradation (El-Sheikh et al., 2011), adsorption (Piccin et al., 2016), ozonation (Bletterie et al., 2012), electrocoagulation (Mella et al., 2016), reverse osmosis (Bhattacharya et al., 2013) are mentioned in the literature. However, many of these wastewater treatment processes involving the addition of chemicals that could contribute to increase in COD and/or BOD, thus causing a secondary pollution (Henze et al., 2001). Traditional biological nutrient removal systems (nitrogen, phosphorus and organic matter) result in generation of a considerable amount of sludge, which require treatment before final disposal (Feng et al., 2003). Furthermore, nitrification step of biological process require specific consideration for the impact of sulfide, chromium and chloride inherently present in the wastewater (Gallego-Molina et al., 2013). High chloride content of the wastewater, which fluctuates around 5000 mg.L^{-1} , can acting as the limiting step for nitrogen removal, inhibition the process of nitrification (Orhon et al., 2000).

The discharge of high nutrients concentration, such as nitrogen and phosphorus, in receiving waters without appropriate treatment, cause its eutrophication and upset the balance of the ecosystem. The major adverse ecological impacts caused by eutrophication are: increase in algae and aquatic plants, fish death, reduction of biodiversity and replacement of dominant species, increase water toxicity, increase turbidity of the water and decrease lifespan of the lakes (Wang et al., 2016).

In face of emerging concern of environmental preservation and governmental regulations of discharges that become more stringent, the development of innovative, sustainable environmentally friendly and low operational cost processes for efficient treatment of wastewater has growing interest of researchers. The use of microalgae by industrial wastewater treatment has attracted great interest in the last decades due to its high capacity of up taking organic and inorganic nutrients (Silva et al., 2015), accumulation of metals (Benabdallah et al., 2017) as well as its high CO₂ fixation efficiency (Hussain et al., 2017) while producing potentially valuable biomass (Gendy and El-Temtamy, 2013). Due to the composition of microalgal biomass, this can be used as animal feed, energy production, fertilizers or to produce fine chemistry products such

as pigments, polysaccharides, carotenes, sterols, vitamins, polyunsaturated fatty acids and lipids (Grima et al., 2003). Researches are focusing on production of biomass and biofuels from microalgae as an alternative energy source combining bioenergy production and wastewater treatment (Aravantinou et al., 2013).

The microalgal biomass production is affected by a combination of environmental parameters. In the synthetic culture medium, the high cost of nutrients may represent a limiting factor for production. When the microalgae are grown in alternative culture medium (industrial or agricultural waste), the limiting factors for the production of biomass are the light intensity, photoperiod, temperature, and agitation culture.

The luminosity plays a fundamental role in microalgae productivity since it provides the energy required for photosynthetic reactions, promoting the conversion of inorganic nutrients dissolved in the medium on organic biomass (Sutherland et al., 2015). Excessive light can cause lethal effect on cells by the formation of hydrogen peroxide (toxic for microalgae) in the presence of oxygen. Such a reaction is called photo-oxidation or fotoxidative death (Hirayama et al., 1996). Therefore, the luminosity factor is essential in a microalgae biological wastewater treatment system (Wang et al., 2007). Microalgae require optimal light to achieve economically the maximum photosynthetic rate and nutrient removal efficiency (Yan et al., 2013).

Many studies have demonstrated the successful use of algal cultures to treat various types of wastewater (Li et al., 2011a,b; Wang et al., 2010; Ji et al., 2014; Jia et al., 2016; Gouveia et al., 2016). The mentioned studies are focused on the growth of microalgae and removal of nutrients of municipal wastewater, dairy industry effluents, waste from swine, and soybean processing wastewater. However many of these cultivations are performed on wastewater were submitted to some previous treatment or that were supplemented with a nutrient.

Studies related to the growth of microalgae and nutrient removals in wastewater of tanneries are still limited. Thus, the aim of this study is to investigate the influence of light intensity and concentration of beamhouse wastewater of tannery without any previous treatment in the biomass production and removing or reducing the nutrients using microalgae *Scenedesmus* sp. as debugger agent.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Microalgae and culture medium

The microalgae *Scenedesmus* sp. was culture in medium Guillard modified (Ramirez et al., 2014) in 250 mL Erlenmeyer flasks and adapted at 25 °C under constant aeration and continuous lighting of 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The growth until the exponential phase culture served as the inoculum. The modified medium contained two different solutions with following concentrations (mg.L^{-1}): a macronutrient solution comprising 367.60 $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$, 369.70 $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 126.00 NaHCO_3 , 87.10 K_2HPO_4 , 850.10 NaNO_3 , 284.20 $\text{Na}_2\text{SiO}_3.9\text{H}_2\text{O}$; and micronutrient solution comprising 43.60 Na_2EDTA , 31.50 $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, 1.80 $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$, 0.06 $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$.

3.2.2 Raw tannery wastewater and characterization

Raw tannery wastewater (RTW) was obtained from a tannery located in Montenegro City in the State of Rio Grande do Sul (Southern Brazil). The wastewater was collected directly after the beamhouse process and characterized by chlorides (Cl^-), pH, biochemical oxygen demand (BOD_5), chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), phosphorus (P) and, ammonical nitrogen (N-NH_3) (APHA, 1998).

3.2.3 Experimental setup and culture conditions

The microalgae cultivations were carried out in 1000 ml flasks containing concentrations of tannery effluent ranging between 20% and 100% and light intensities ranging between 80 and 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ with cycle light/dark 12:12 h. Autoclaved distilled water was used in dilutions of tannery effluent. The volume of inoculum (from exponential phase) was standardized for all tests to a OD_{570} of 0.2. Cultures were grown in batch mode for 24 days at room temperature (25 °C). Agitation was obtained by bubbling compressed air (1 L.min^{-1}) in the bottom of the flasks.

3.2.4 Determination of microalgae growth

The culture was monitored daily by optical density (OD) measured at a wavelength of 570 nm using a spectrophotometer (Model T80 + UV/Vis, PG

Instruments) after appropriate dilution. The dried biomass was measured by filtering the samples through 0.7 μm pre-weighed membranes, which were dried at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h.

The specific growth rate (μ , d^{-1}) in exponential phase of algal growth was measured according to Equation (1):

$$\mu = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1 - t_0} \quad (1)$$

where X_1 and X_0 are biomass concentrations (g.L^{-1}) at time (d) t_1 and t_0 (t_1 were considered the end of the exponential growth phase and t_0 the beginning of the exponential growth phase).

Biomass productivities (P_x) were calculated from the variation in biomass concentration within a cultivation time, as shown in Equation (2):

$$P_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

3.2.5 Analysis of removal of contaminants

The determinations of ammonia nitrogen (N-NH₃), phosphorus (P-PO₄) and chemical oxygen demand (COD) were performed at the beginning and the end of the experiment or assay. The parameters N-NH₃ and P were characterized using ion chromatography (METROHM 20000) and COD was characterized according to methods described by APHA (1998). The analyzes were performed in triplicate and the removal of the compound was calculated by Equation (3):

$$\text{Removal}(\%) = \left(\frac{x_i - x_f}{x_i} \right) * 100 \quad (3)$$

where x_i and x_f are the concentrations of the compounds N-NH₃, P-PO₄, COD before and after the biomass growth, respectively.

The results of removals of ammoniacal nitrogen (N-NH₃), phosphorus (P-PO₄) and Chemical Oxygen Demand (COD) were analyzed using the Statistica 12.0 software, by analysis of variance (ANOVA) with a confidence interval of 95% and response surface methodology.

3.2.6. Experimental design

A 2^2 central composite design (CCD) was used to study the influence of light intensity and the tannery effluent concentration on the *Scenedesmus* sp. growth and removal wastewater pollutants. The variation ranges between the upper and lower limits of the independent variables were established according to previous studies of this research group. Table 3.1 shows the experimental design.

Table 3.1: Real and codified values of the variables used in the 2^2 central composite design.

Assay	Conc. Tannery wastewater (%)	Light Intensity ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
1	31.6 (-1)	97.5 (-1)
2	88.4 (1)	97.5 (-1)
3	31.6 (-1)	182.5 (1)
4	88.4 (1)	182.5 (1)
5	20 (- α)	140 (0)
6	100 (α)	140 (0)
7	60 (0)	80 (- α)
8	60 (0)	200 (α)
9	60 (0)	140 (0)
10	60 (0)	140 (0)
11	60 (0)	140 (0)

$\alpha=1,414$

A control experiment (without addition of inoculum) was performed out at the central point of the CCD (60% of wastewater and $140 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensity). In this experiment neither biomass growth nor nutrients removal was verified.

3.3 Results and discussion

3.3.1 Physicochemical characteristics of the wastewater tannery

The results presented in Table 3.2 of the raw wastewater revealed high concentrations of chlorides, organic matter and nitrogen compounds. The physicochemical characteristics of the tannery wastewater used in this study were within the range of the values recorded by Gutterres et al. (2015). The constituents of the beamhouse wastewater will differ from one tannery to other, according the chemicals used, the production processes employed and raw materials used in this industry.

Table 3.2: Physicochemical characteristics of the beamhouse tannery wastewater.

Parameter	Value
pH	7.5
TOC	1692 mg.L ⁻¹
Cl ⁻	7683 mg.L ⁻¹
BOD	1400 mg.L ⁻¹
COD	4000 mg.L ⁻¹
P-PO ₄	6.6 mg.L ⁻¹
N-NH ₃	343 mg.L ⁻¹

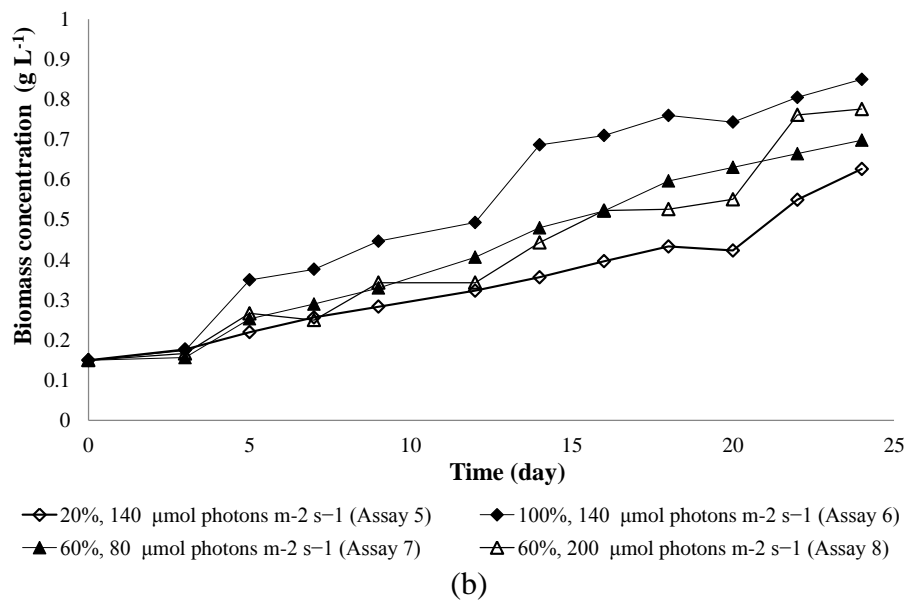
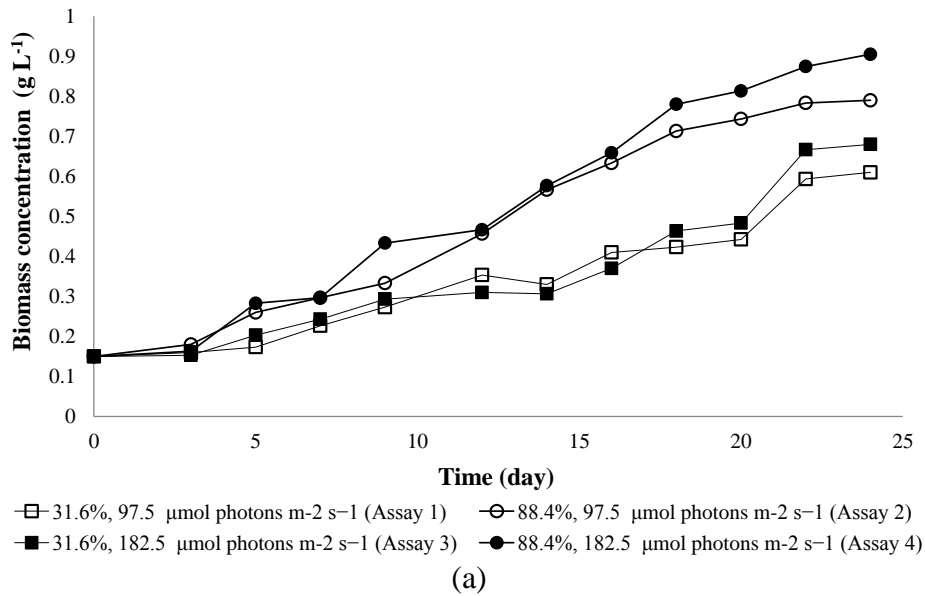
3.3.2. Growth of *Scenedesmus* sp. in tannery wastewater by different cultivation conditions

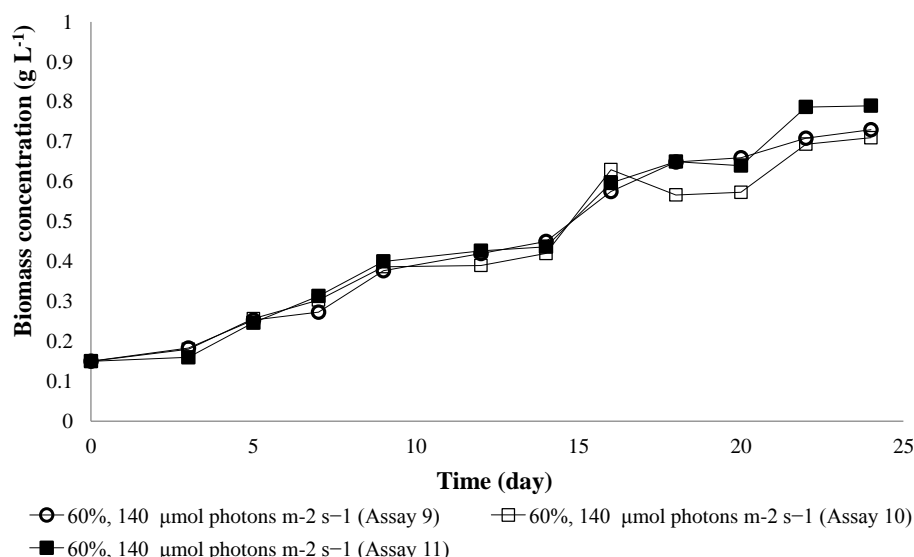
Figures 3.1a, 3.1b, 3.1c show the biomass growth curves (g.L⁻¹) of microalgae *Scenedesmus* sp. obtained for each treatment of factorial design. The growth parameters, such as maximum biomass concentration, maximum productivity, and maximum specific growth rate of *Scenedesmus* sp. in different cultivation conditions are given in Table 3.3.

The growth of microalgae *Scenedesmus* sp. increased gradually with the time in all the cultivation conditions. The curves illustrate characteristic growth phases in a batch culture of microalgae, all cultures have shown a lag phase (phase of adaptation of microalgae to the effluent) of about 3 days. The stationary and decaying phases, were not observed in the assays. Assays 9, 10 and 11 (Fig. 3.1c) represent triplicate center point of the central composite design, the growth curve behavior and the final biomass was similar for the three assays. This shows that the assays tend to be reproductive. According to Moazami et al. (2012) the stationary and decaying phases would appear after about 12 days and 18 days, respectively. However for this study the initial phase of adaptation may have delayed the stationary and decaying phases development.

In the CCD employed, the highest concentrations of microalgae biomass were achieved for assay 4 (0.90 g.L⁻¹) and assay 6 (0.85 g.L⁻¹) (see Table 3.3). The assays with less wastewater concentration (assay 1, 3 and 5) presented the lower biomass concentration (0.61 g.L⁻¹, 0.68 g.L⁻¹ and 0.62 g.L⁻¹ respectively). The highest value of the specific growth rate (0.081 d⁻¹) was also observed for assay 4 in the cultivation conditions of wastewater 88.4% and light intensity of 182.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. While the higher biomass productivity (210.52 mg.L⁻¹.d⁻¹) was observed for the assay 8 with higher light intensity 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 60% of wastewater. The increase in concentration of wastewater resulted in increase of biomass, higher specific

growth rate and higher biomass productivity for assays with same light intensity, such as in the cases 1 - 2 and 3 - 4. This behavior was also observed in assay with the same concentration of wastewater and higher light intensity, in the cases 1 - 3 and 2 - 4.





(c)

Figure 3.1: Biomass growth curves for *Scenedesmus* sp. over time for the assays: (a) tannery wastewater concentration of 31.6% and 88.4% and light intensity of 97.5 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 182.5 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, (b) tannery wastewater concentration of 20%, 60% and 100% and light intensity of 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 140 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, (c) tannery wastewater concentration of 60% and light intensity of 140 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (triplicate).

Table 3.3: Growth parameters of *Scenedesmus* sp. in the Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity

Assay	Biomass concentration (g.L ⁻¹)	Specific growth rate (day ⁻¹)	Biomass productivity (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	0.61	0.066	123.30
2	0.79	0.070	151.00
3	0.68	0.071	136.63
4	0.90	0.081	183.33
5	0.62	0.060	127.67
6	0.85	0.075	193.33
7	0.70	0.071	96.67
8	0.78	0.073	210.52
9*	0.73	0.065	125.40
10*	0.71	0.065	210.00
11*	0.79	0.076	159.93
Average and SD*	0.74 ± 0.04	0.068 ± 0.006	165.11 ± 42.54

* Average and standard deviation (SD) at the central point (9, 10 and 11).

Ho et al. (2012) studied the effect of luminosity (light intensity of 60, 180, 300, 420 and 540 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) in the biomass production of microalgae *Scenedesmus obliquus* CNW-N. The authors observed a positive relation between light intensity and biomass productivity, before photo-inhibition, which occurred in the luminous intensity of the 540 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Maximum biomass productivity of

840.56 mg.L⁻¹.d⁻¹ in the light intensity of 420 μmol photons.m⁻².s⁻¹. Ramirez et al. (2014) evaluated the feasibility of cultivation of microalgae *Scenedesmus* sp. in medium supplemented with vinasse (0 - 40%) in different luminous intensity (48 - 200 μmol photons.m⁻².s⁻¹) and temperature (20 – 35 °C). The results of CCD showed that is possible to cultivate microalgae in concentrations of up to 40% of vinasse into the culture medium, but better results were obtained for biomass produced vinasse smaller concentrations in the medium and higher light intensities. The variable temperature had no significant effect.

3.3.3 Nutrient removal in tannery wastewater in different cultivation

Ammoniacal nitrogen (N-NH₃), phosphorus (P-PO₄) and chemical oxygen demand (COD) in all different cultivation conditions decreased during the culturing time. The initial and final concentrations and removal efficiency of ammoniacal nitrogen, phosphorus, and chemical oxygen demand based on the CCD are tabulated in Table 3.4. High removal of ammoniacal nitrogen of 77.57%, 85.63% and 80.05% and phosphorus of 94.65%, 96.78% and 96.64% were observed in assays with greater tannery wastewater concentration, such as assay 2 and 4 (88.4%) and assay 6 (100%), respectively. High values of ammoniacal nitrogen removal (76.59%) and phosphorus removal (95.37%) were also observed for assay 8 which had the greater luminous intensity of 200 μmol photons.m⁻².s⁻¹ but the wastewater concentration 60%.

Metabolism of nitrogen and phosphorus present in the wastewater by microorganisms is directly linked to biomass production and metabolic activities. Nitrogen is an important macro-element in living organisms, including microalgae, as constituent of biomass which can range from 1% to more than 10% by dry weight and is dependent upon the amount, availability, and type of the nitrogen source (Richmond, 2004). Microalgae require this nutrient to produce important biological substances, such as proteins, chlorophylls, energy transfer molecules (ADP and ATP) and genetic materials (RNA and DNA) (Silva et al., 2015). The assimilation of inorganic nitrogen is performed in the form of nitrate, nitrite and ammonia. The ammonia nitrogen N-NH₃ is the most reduced form of nitrogen compounds and therefore is more easily assimilated by microalgae. Generally, microalgae not consume nitrite and nitrate until all ammoniacal nitrogen is almost completely consumed (Maestrini et al., 1986).

Phosphorus is an essential element for microalgae growth and plays several roles in microalgae which includes the formation of phospholipids (for cell membranes),

nucleotides (biosynthesis of DNAs) and nucleic acids for microorganism growth and adenosine triphosphate (to carry energy for cell functions), among other functions (Cai *et al.*, 2013). The algae biomass typically contains 0.5 - 3.3% of phosphorus (Richmond, 2004). The phosphorus is assimilated as inorganic orthophosphate, preferably as H_2PO_4^- or HPO_4^{2-} (Becker, 1994). COD concentrations of each assay decreased in the 24-day period, especially to assays 2, 3, 4 and 6, which had high removals of 79.51, 76.82%, 80.33% and 75.30% respectively.

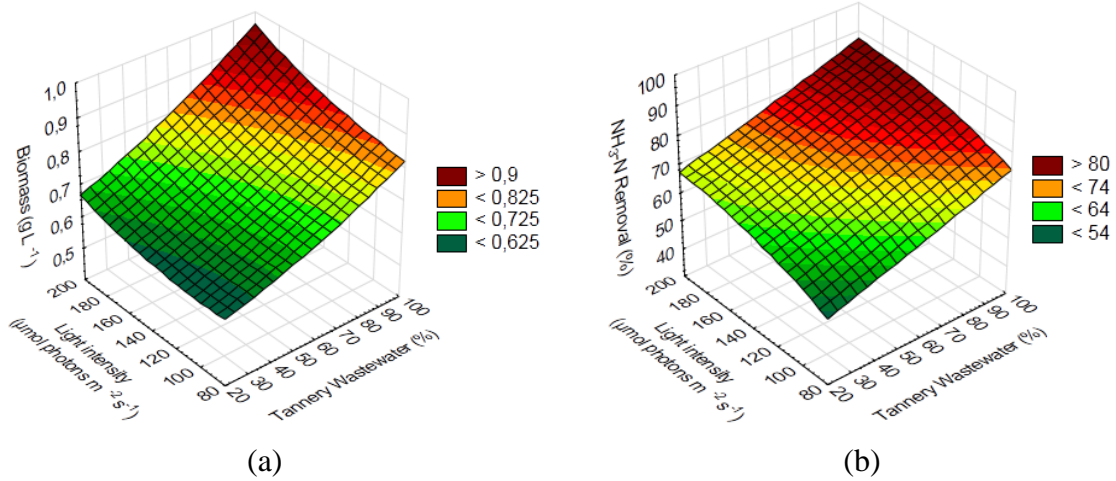
Table 3.4: Initial (IC) and final concentration (FC) and removal efficiency (RE) of ammoniacal nitrogen (N-NH₃), phosphorus (P-PO₄) and chemical oxygen demand (COD) in the Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity.

Assay	Nutrient concentration (mg.L ⁻¹)** and Removal efficiency (%)***								
	N-NH ₃			P-PO ₄			COD		
	IC**	FC**	RE***	IC**	FC**	RE***	IC**	FC**	RE***
1	109.49	43.33	60.42	2.08	0.28	86.53	1282.06	404.09	68.48
2	300.04	67.30	77.57	5.84	0.31	94.65	3581.67	733.78	79.51
3	117.87	36.83	68.75	2.08	0.25	87.39	1264.53	293.19	76.82
4	293.90	42.23	85.63	5.83	0.18	96.78	3544.32	697.26	80.33
5	64.77	23.88	63.13	1.32	0.20	84.17	789.17	429.85	45.53
6	338.88	67.60	80.05	6.68	0.22	96.64	4036.97	996.83	75.30
7	207.81	82.10	60.49	3.96	0.41	89.50	2447.02	1040.90	57.46
8	214.62	50.24	76.59	3.87	0.18	95.37	2439.75	734.05	69.91
9*	216.36	52.38	75.79	3.92	0.22	94.24	2462.41	791.97	67.83
10*	220.43	52.83	76.03	3.84	0.21	94.39	2474.66	949.96	61.62
11*	210.29	63.46	69.82	3.90	0.27	93.16	2442.95	927.66	62.03
Average and SD*	215.69 ± 5.10	56.22 ± 6.27	73.88 ± 3.52	3.88 ± 0.04	0.23 ± 0.03	93.93 ± 0.67	2460.00 ± 15.99	889.86 ± 85.50	63.83 ± 3.47

*Average and standard deviation (SD) at the central point (9, 10 and 11).

High removals of total nitrogen (82.51 - 91.28%) and total phosphorus (53.05 - 88.72%) were also observed by Jia et al. (2016) when cultivated microalgae *Scenedesmus* sp. in different dilutions of anaerobic digested wastewater - ADWW (5 - 15%). Gouveia et al., (2016) cultivated the microalgae *Scenedesmus Obliquus* in urban wastewater after primary treatment. The authors verified high removals of nitrogen (95%), phosphorus (92%) and COD (63%). Kim et al. (2015) cultivated the microalgae *Scenedesmus* sp. isolated, in effluent from anaerobic digester (AD) containing low carbon but high nutrients ($N-NH_3 = 273 \text{ mg.L}^{-1}$, total P = 58.75 mg.L^{-1}). This algae-based treatment was quite effective: nutrient removal efficiencies were over 99.19% for nitrogen and 98.01% for phosphorus.

The results presented in Fig. 3.2a, b, c and d show the surface responses of biomass, $N-NH_3$, $P-PO_4$, COD removal due to the influence of the independent variables tannery wastewater concentration and light intensity. It can be observed in the figures that the increases of light intensity and of effluent concentration cause the increases in biomass production and an in the removal of ammoniacal nitrogen and phosphorus.



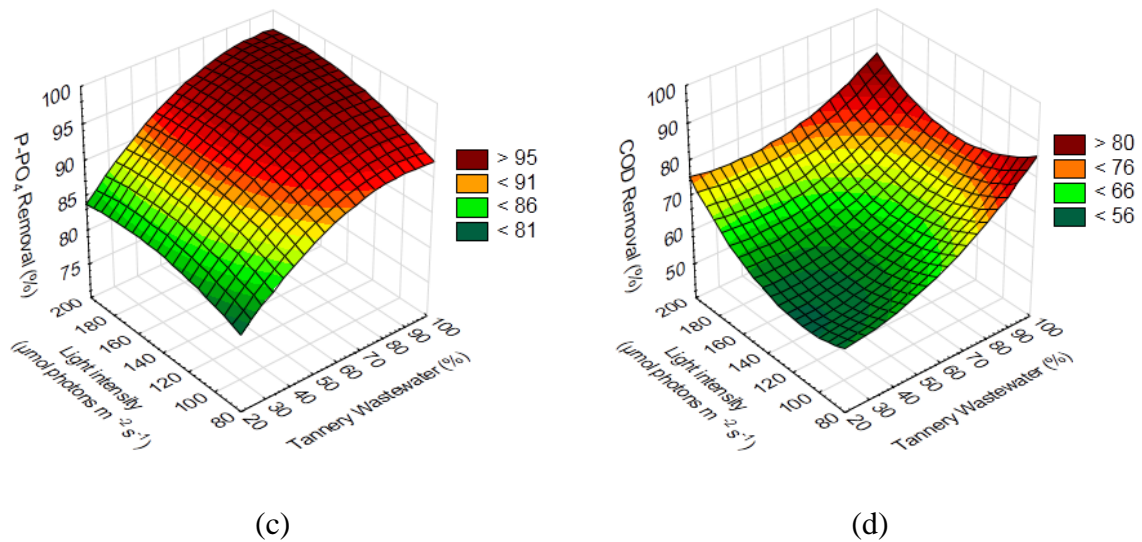


Figure 3.2: Response surface to influence of tannery wastewater concentration (%) and light intensity ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) on (a) Biomass (g.L^{-1}), (b) N-NH_3 removal (%), (c) P-PO_4 removal (%) and (d) COD removal (%).

Tables 3.5, 3.6, 3.7, and 3.8 presented the analysis of variance. The linear effects of tannery wastewater concentration and light intensity showed significant influences on biomass responses ($p = 0.000323$ and $p = 0.008934$, respectively), ammoniacal nitrogen removal ($p = 0.005039$ and $p = 0.019577$, respectively) and phosphorus removal ($p = 0.000193$ and $p = 0.013461$, respectively) for a 95% confidence level. For the variable response P-PO_4 removal the quadratic term variable tannery wastewater with value of $p = 0.011072$ also was significant. Already the response variable COD removal was not significantly influence the independent variable light intensity and tannery wastewater.

Table 3.5: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response biomass

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tannery wastewater (%) (L)	0.063	1	0.0632	133.0706	0.0003
Tannery wastewater (%) (Q)	0.0007	1	0.0007	1.5133	0.2860
(2)Light intensity ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (L)	0.0107	1	0.0107	22.6152	0.0089
Light intensity ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Q)	0.0002	1	0.0002	0.5442	0.5016
1L by 2L	0.0004	1	0.0004	0.8416	0.4108
Error	0.0019	4	0.0004		
Total SS	0.0770	9			

$R^2 = 0.9753$

Table 3.6: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response ammoniacal nitrogen removal (N-NH₃)

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tannery wastewater (%) (L)	420.195	1	420.1955	31.1991	0.0050
Tannery wastewater (%)(Q)	0.125	1	0.1255	0.00932	0.9277
(2)Light intensity (μmol photons.m⁻².s⁻¹) (L)	191.584	1	191.5841	14.2253	0.0195
Light intensity (μmol photons.m ⁻² .s ⁻¹)(Q)	8.5137	1	8.5137	0.63215	0.4710
1L by 2L	0.0182	1	0.0182	0.00135	0.9724
Error	53.8714	4	13.4678		
Total SS	677.295	9			

R²= 0.9204

Table 3.7: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response phosphorus removal (P-PO₄)

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tannery wastewater (%) (L)	154.3956	1	154.3956	172.8922	0.0002
Tannery wastewater (%)(Q)	17.8457	1	17.8457	19.9836	0.0111
(2)Light intensity (μmol photons.m⁻².s⁻¹) (L)	15.9149	1	15.9149	17.8215	0.0134
Light intensity (μmol photons.m ⁻² .s ⁻¹)(Q)	4.1928	1	4.1928	4.6951	0.0961
1L by 2L	0.4032	1	0.4032	0.4515	0.5384
Error	3.5721	4	0.8930		
Total SS	192.2074	9			

R²= 0.9814

Table 3.8: Analysis of variance - Central Composite Design considering tannery wastewater concentration and light intensity for the variable response chemical oxygen demand (COD)

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tannery wastewater (%) (L)	21.4351	1	21.4351	0.1499	0.7183
Tannery wastewater (%)(Q)	307.0349	1	307.0349	2.1471	0.2167
(2)Light intensity (μmol photons.m⁻².s⁻¹) (L)	114.6875	1	114.6875	0.8020	0.4211
Light intensity (μmol photons.m ⁻² .s ⁻¹)(Q)	94.5716	1	94.5716	0.6614	0.4617
1L by 2L	14.1376	1	14.1376	0.0988	0.7689
Error	571.980	4	142.9949		
Total SS	1115.702	9			

R²= 0.7873

3.4 Conclusion

This study showed that the microalgae *Scenedesmus* sp. can grows in tannery wastewater. The central composite design (CCD) showed that concentration of wastewater and light intensity influence the amount of biomass produced, and the removal of ammoniacal nitrogen and phosphorus. The cultivation of *Scenedesmus* sp. showed maximum biomass concentration (0.90 g.L⁻¹), maximum specific growth rate (0.081 d⁻¹) for the tannery wastewater concentration of 88.4% and light intensity of 182.5μmol photons.m⁻².s⁻¹, while maximum biomass productivity (210.52 mg.L⁻¹ day⁻¹)

¹) was observed for the assay with higher light intensity $200 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 60% of wastewater. The cultivation of microalgae in the effluent of tannery showed high removal capacity of ammoniacal nitrogen (85.631%), phosphorus (96.78%) and COD (80.33%). Thus, the study showed that tannery wastewater can be used to an alternative source of nutrients for the production of biomass microalgae.

3.5 Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the study grant and Financier of Studies and Projects (FINEP) in the Project Ref. 1097/13 approved the MCTI/FINEP CT-HYDRO 01/2013.

3.6 References

- Achouri, O., Panico, A., M. Lehocine, B., Derbal, K., and Pirozzi, F., 2017. Effect of Chemical Coagulation Pretreatment on Anaerobic Digestion of Tannery Wastewater. *J. Environ. Eng.* 149.
- American Public Health Association Standard methods for the Examination of water and wastewater-APHA. 20th ed. 1998. Washington DC.
- Aquim, P.M., Gutterres, M., Trierweiler, J.O., 2010 .Assessment of water management in tanneries. *J. Soc. Leath. Tech. Ch.* 94, 253–258.
- Aravantinou, A. F., Theodorakopoulos, M. A., Manariotis, I. D., 2013. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids Production. *Bioresour. Technol.* 147, 130–134.
- Becker, E.W., Baddiley, J., 1994. *Oil Production in Microalgae: Biotechnology and Microbiology.* Cambridge University Press, 1994. *Bioresour. Technol.* 106, 63–68.
- Benabdallah, N. K., Harrache, D., Mir, A., De La Guardia, M., Benhachem, F. Z., 2017. Bioaccumulation of trace metals by red alga *Corallina elongata* in the coast of Beni Saf, west coast, Algeria. *Chem. Intern.* 3(3), 220-231.
- Bletterie, U., Schilling, K., Delgado, L., Zessner, M., 2012. Ozonation as a Post-Treatment Step for Tannery Wastewater to Reduce Foam Formation in a River. *Ozone: Sci. Eng.* 34, 397–404.
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y.B., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew Sust Energ Rev.* 19, 360–369.
- El-Sheikh, M.A., Hazem, I., Saleh, J., Flora, J. R., Abd El-Ghany, M. R., 2011. Biological tannery wastewater treatment using two stage UASB reactors. *Desalination* 276. 253–9.
- Feng, C., Sugiura, N., Shimada, S., Maekawa, T., 2003. Development of a high performance electrochemical wastewater treatment system. *J. Hazard Mater.* 103, 65-78.

- Gallego M.A., Mendoza R.J.A., Aguado D., Galiana A.M.V., 2013. Reducing pollution from the delimiting–bating operation in a tannery.Wastewater reuse by microfiltration membranes. *Chem. Eng. Res. Des.* 91, 369–76.
- Gendy, T. S. & El-Temtamy, S. A., 2013. Commercialization potential aspects of microalgae for biofuel production: An overview. *Egyptian Journal of Petroleum*, 22, 43-51.
- Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C, Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro Neto, P., Ferreira, A.F., Silva, C.M., 2016. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations. *Algal Res.* 16, 167–176.
- Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernandez, F.G.A., Medina, A.R., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515.
- Gutterres, M., Benvenuti, J., Fontoura, J.T., Ortiz-Monsalve, S., 2015. Characterization of Raw Wastewater from Tanneries. *J. Soc. Leath. Tech. Ch.* 99, 280-287.
- Henze, M., Harremoes, P., La Courjansen, J., Arvin, E., Wastewater treatment:biological and chemical processes, 3rd. *Springer*, Berlin, 2001.
- Hirayama, S., Ueda, R., Sugata, K., 1996. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Free Radical Res.* 25, 247-257.
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Chang, J.S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalgae *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 113, 244–252.
- Hussain, F., shah, S. Z., Zhou W., Iqbal, M., 2017. Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micro-nutrients removal efficiency. *J. Photoch. Photobio. B.* 170, 91–98.
- Ji, F., Liu Y., Hao, R., Li, G., Zhou, Y., Dong, R., 2014. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresour. Technol.* 161, 200–207.
- Jia, Q., Xiang, W., Yang, F., Hu, Q., Tang, M., Chen, C., Wang, G., Dail, S., Wu, H., Wu, H., 2016. Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. *J. Appl Phycol.* 28, 727–736,
- Kim, G.Y., Yun, Y.M., Shin, H.S., Kim, H.S., Han, J.I., 2015. *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresour. Technol.* 196, 235–240.
- Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R., 2011a. Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater in nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 5138–5144.
- Li, Y., Zhou, W., Bing, H., Min, M., Chen, P.; Ruan, R.R. 2011b. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresour. Technol.* 102, 10861–10867.

- Maestrini, S.Y.; Collos, Y.; Leftley, J.W., 1986. Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 75–98.
- Martínez, M.E., Sánchez, S., Jiménez, J.M., EL Yousfi, F., Muñoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 73, 263-272.
- Mella, B., Glanert, A.C.C., Gutterres, M., 2016. Removal of Chromium from Tanning Wastewater by Chemical Precipitation and Electrocoagulation. *J. Soc. Leath. Tech. Ch.* 100, 55-61.
- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Eghtesadi, R., Sheykhi Nejad, A., 2012. Large- scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenerg.* 39, 449–453.
- Orhon, D., Ates, Genceli, E. and Sözen, S., 2000. Experimental evaluation of the nitrification kinetics for tannery wastewaters. *Water SA* 26(1), 43–50.
- Piccin, J.S., Gomes, C.S., Mella, B., Gutterres, M., 2016. Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, 1061–1067.
- Ramirez, N.N.V., Farenzena, M., Trierweiler, J.O., 2014. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp. in ethanol vinasse. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57, 630-635.
- Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Science Ltd. Blackwell, 2004.
- Silva, N.F.P., Gonçalves, A.L., Moreira, F.C., Silva, T.F.C.V., Martins, F.G., Alvim-Ferraz, M.C.M., Boaventura, R.A.R., Vilar, V.J.P., Pires, J.C.M., 2015. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Research.* 11, 350–358.
- Sun, G. X., Cai, X., Yu, C.Z., 2006. TiO₂ photocatalytic degradation of organical and prospect of the technology in tannery wastewater treatment. *China Leather* 35, 33–36.
- Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J., 2015. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water res.* 70, 9-26.
- Wang, C.Y., Fu, C.C., Liu, Y.C., 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.* 27, 21–25.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Sealock, A., Chen, Y., Ruan, R. R. 2010a. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour. Technol.* 101 (8), 2623–2628.
- Wang, Y., Zeng, Y., Zhou, J., Zhang, W., Liao, X., Shi, B., 2016. An integrated cleaner beamhouse process for minimization of nitrogen pollution in leather manufacture. *J. Clean. Prod.* 112, 2-8.
- Yan, C., Zhao, Y., Zheng Z., Luo, X., 2013. Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by *Chlorella vulgaris*. *Biodegradation*, 24, 721–732.

Capítulo 4

Using tannery wastewater as source of nutrients for microalgae *Scenedesmus* sp.

Artigo enviado para publicação no periódico: *Biochemical Engineering Journal* (BEJ) em 13/09/2017.

Neste artigo a microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em fotobiorreatores *airlift* de 3 L em diluições de 25%, 50% e 100% de efluente de curtume bruto sem tratamento prévio, com luminosidade e aeração constantes. Para verificar a eficiência de remoção, os efluentes (brutos e tratados) foram caracterizados por análise de nitrogênio total (NT), nitrogênio amoniacal (NH₃-N), fósforo (PO₄-P), carbono inorgânico (CI), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Neste estudo também caracterizou-se a biomassa microalgal quanto a sua composição bioquímica em carboidratos, proteínas e lipídios, bem como a composição dos teores de ácidos graxos de cada biomassa cultivada nas diferentes condições.

Using tannery wastewater as source of nutrients for microalgae *Scenedesmus* sp.

Juliana Tolfo da Fontoura¹, Marcelo Farenzena², Guilherme Sebastião Rolim¹, Rodrigo Eckert Renner^{3,4}, Luiz Antonio Mazzini Fontoura^{4,5}, and Mariliz Gutterres¹

¹Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO),²Laboratory of Process Control and Integration (LACIP), Chemical Engineering Post-graduated Program (PPGEQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Luiz Englert s/n°, Porto Alegre-RS, Brazil, 90040-040, (51)3308-3954,

³University of Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Av. Unisinos, 950 - Cristo Rei, São Leopoldo - RS, Brazil, 93022-000, (51) 3591-1122.

⁴Foundation for Science and Technology (CIENTEC), Av. das Indústrias, 2270, Cachoeirinha-RS, Brazil, 94930-230, (51) 34396360,

⁵Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Av. Farroupilha, 8001 - São José, Canoas - RS, Brazil, 92425-900, (51) 3477-4000
jutolfo@enq.ufrgs.br, mariliz@enq.ufrgs.br

ABSTRACT: The scope of this work is to use raw tanning wastewater without pretreatment as an alternative culture medium for the production of microalgae biomass aiming at the treatment of this wastewater. The microalgae *Scenedesmus* sp. grown in airlift photobioreactors was evaluated for their capability to support nutrient removal and to accumulate lipids, protein and carbohydrate in their cell during a 20-day treatment of tannery wastewater. The cultivation of *Scenedesmus* sp. presented maximum biomass concentration of 1.75 g.L^{-1} for the culture condition without dilution of the wastewater. In this cultivation condition (TW100%), the highest nutrient removal rates ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) TN (13.16 ± 0.71), $\text{NH}_3\text{-N}$ (8.14 ± 0.31), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.17), IC (1.66 ± 0.11), COD (43.94 ± 3.43), and BOD (23.33 ± 2.14) and higher productivity of protein ($22.85 \pm 0.34 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), carbohydrates ($19.67 \pm 1.15 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), and lipids ($16.75 \pm 0.76 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), was observed. This study showed the potential of *Scenedesmus* sp. for biomass production and simultaneous nutrient removal from tannery wastewater, linking the wastewater treatment process with the production of biofuels.

Keywords: Tannery wastewater, *Scenedesmus* sp., wastewater treatment, biomass production, biodiesel.

4.1 INTRODUCTION

Meeting global energy demand has been a great challenge to modern societies. The environmental concerns associated with burning fossil fuels have claimed to the development of new, clean and sustainable energy sources. Microalgae have high productivity rates, synthesize bioproducts such as lipids and carbohydrates, do not occupy fertile lands, and can be grown using industrial effluents as a nutrient source, linking effluent treatment to biofuels with potential biofuel production. An effluent of

interest for the production of microalgal biomass is the raw tannery wastewaters [1,2]. The tannery wastewaters are characterized by high concentrations of chlorides, organic matter (COD, BOD, TOC), organic and inorganic nitrogen. In addition, dyes, sulfides, chromium, phenols, surfactants and biocides are present [3].

Several studies reported that microalgae have great potential for the removal of nitrogen and phosphorus from wastewater. Species of microalgae such as *Chlorella* [4], *Scenedesmus* [5], *Spirulina* [6] can be used to fulfill this task.

Microalgae use these chemical nitrogenous species as nutrients relevant to metabolic activities and biomass synthesis. Microalgae cells store nitrogen, phosphorus and carbon for the synthesis of proteins, lipids, carbohydrates, adenosine triphosphates (ATP) and other biomolecular forms [7]. The microalgae regulated metabolic routes that will adjust to the nitrogen forms available in the medium, in order to promote the assimilation and fixation of this compound.

Due to their macromolecular composition, several commercial products can be obtained from the microalgae biomass [8]: for human consumption or animal nutrition, fine chemicals, biofuels and fertilizers. Microalgae cultures have been already carried out on a large scale, mainly for food products of high nutritional value. However, the production for bioenergy is not yet economically feasible. Several researches are being carried out to reduce costs of biomass production.

The productivity of microalgae lipids (dry weight) is 15-300 times greater than that of conventional agricultural crops. In addition, the growth rate of microalgae is faster than other photosynthetic plants, indicating a high productivity per cultivated area [9]. Microalgae production requires a small area of land for crops than other biodiesel feedstocks of agricultural origin, up to 49-132 times less when compared to colza or soybean crops, for an oil content of 30% in biomass algal [9,10]. Thus, competition for arable land with other crops, particularly for human consumption, is very low. The oil extracted from microalgae has characteristics similar to those of most traditional oleaginous plant oils and can produce biodiesel with the necessary characteristics to be in accordance with EN 14214 and ASTM D6751 quality requirements [11].

There has been intense research interest in the production of biofuels from microalgae as an alternative source of energy, combining the production of bioenergy with wastewater treatment. Several studies that have explored the growth of microalgae and the nutrient removal efficiencies of a variety of wastewater [12,13,14,15]. Studies that

use microalgae in the treatment of tannery effluent have reported relevant results regarding the removal of nutrients [16,17,18,19,20,21].

Considering that one significant cost is the nutrient requirement for microalgae growth, combined with the capacity of wastewater treatment, the aim of this work is to investigate growth feasibility of the microalgae *Scenedesmus* sp. to assimilate nutrients from tannery effluent without any previous treatment. The algal biomass chemical composition was also characterized and the potential application of lipids to biodiesel production was verified.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Microalga and effluent of tannery

The culture was maintained in medium Guillard Modified in 250 mL Erlenmeyer flasks and adapted at 25 °C, under constant aeration and continuous lighting of 80 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, with photoperiod of 12 hours clear and 12 hours dark. The growth until the exponential phase culture served as the inoculum. The effluent was obtained from a tannery located in Montenegro, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The raw wastewater samples were collected directly from the beamhouse process.

4.2.2 Experimental setup and culture conditions

Cultures of microalgae were performed on 3 L photobioreactor airlift, under continuous light intensities of 200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, for 20 days at room temperature (25 °C). Aeration was obtained by bubbling compressed air at a flow rate of 1 L min^{-1} . The airflows were controlled using rotameters. The volume of inoculum (from the exponential phase) was standardized for all the tests at a proportion of 10.0% (v/v), considering to a final volume of 2.8 L. The microalga was cultivated in tannery wastewater without pretreatment under the dilutions conditions of 25% (TW25%), 50% (TW50%) and 100% effluent without dilution (TW100%). The microalgae were also cultured in the modified Guillard medium, this condition was used as control. All cultures were performed in duplicate. The dilutions conditions of tannery wastewater without pretreatment were established according to previous studies carried out by the authors.

4.2.3 Evaluation of biomass growth

The biomass concentration (X , g.L⁻¹) was monitored daily by optical density (OD) measured at 570 nm using a T80+UV/Vis spectrophotometer (PG Instruments) after appropriate dilution. The dry cell mass of microalgae biomass was measured by gravimetry, where samples of known volumes were filtered through 0.7 µm porous pre-weighed filters and oven dried at 100 °C for 24 h. The relationship between biomass dry weight and optical density (OD₅₇₀) was estimated using the linear regression ($R^2 = 0.997$) presented in Equation 1:

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0.3649 \times \text{OD}_{570} - 0.019 \quad (1)$$

The biomass concentration (X , g.L⁻¹) was used to determine the specific growth rate (μ , d⁻¹) and biomass productivity (P_x , g.L⁻¹.d⁻¹). During the exponential growth phase, the specific growth rate was calculated according to Equation 2 [22]:

$$\mu = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

where X_1 and X_0 are the biomass concentrations at times t_1 and t_0 (the end and the beginning of the exponential growth phase), respectively.

Biomass productivity (P_x) was calculated from the difference in biomass concentration per unit time for two consecutive samples (Eq. 3):

$$P_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \quad (3)$$

In order to compare this parameter between the different cultures, the average productivity (P_{aver}) and the maximum productivity (P_{max}) were determined.

4.2.4 Analysis of the removal of pollutants

The determination of total nitrogen (TN) and inorganic carbon (IC) were performed using a total organic carbon analyzer (model TOC-L TNM, Shimadzu). The parameters ammoniacal nitrogen (NH₃-N), phosphorus (PO₄-P), chemical oxygen demand (COD), and biochemical oxygen demand (BOD) were measured according to the methodology described by APHA [23].

In this study, the nutrient removal by microalgae, (RE, %) nutrient uptake was verified by percentage of removal (Eq. 4) removal rates (Eq. 5) and substrate conversion factor in biomass (Eq. 6) [24,25].

$$\text{RE (\%)} = \frac{(S_0 - S_i)}{S_0} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{RR (mg L}^{-1}\text{d}^{-1}\text{)} = \frac{(S_0 - S_i)}{(t_i - t_0)} \quad (5)$$

$$Y = \frac{(S_0 - S_i)}{(X_i - X_0)} \quad (6)$$

where RR represents the removal rate of nutrients, S_0 represents the initial concentration of nutrients, S_i is the nutrient concentration at time t_i , t_i is the time when there was no significant decrease of nutrients, t_0 is the initial time of cultivation, X_i represents for the biomass concentration with respect to the nutrient S_i .

4.2.5 Determination of microalgae composition

Total lipids were extracted using the solvents chloroform:methanol (1:1, v/v) according to methodology described by Bligh and Dyer [26]. Organic phase containing lipid was vacuum dried. The lipid weight was calculated gravimetrically and expressed as % of dry weight. The protein content in the microalgae was estimated by Equation (7), where the nitrogen content N (% dry weight) was multiplied by a factor suggested in the literature [27].

$$\text{Protein (\%)} = 6.25 \times \text{N} \quad (7)$$

Carbohydrate extraction was performed by treating the dried samples with H_2SO_4 80% for 20 h. The total carbohydrate content was determined by the method using phenol-sulfuric acid as an indicator [28]. The analytical curve was prepared using glucose standards and the microalgae total carbohydrate content was determined in a spectrophotometer at 490 nm.

Carbohydrate $P_{(C)}$, protein $P_{(P)}$ and lipids $P_{(L)}$ productivity, were calculated according to the Equation (8):

$$P_{(C,P,L)} = \frac{X_f \times C_{(C,P,L)}}{100 \times t_f} \quad (8)$$

where X_f is the final biomass concentration, $C_{(C,P,L)}$ the carbohydrate, protein and lipids concentration and t_f the final culture time.

4.2.6 In-situ transesterification

Fatty acid ethyl esters were obtained by transesterification of lipids following the methodology proposed by Guzzato [29]. The transesterifications were conducted in a round-bottom flask equipped with a reflux condenser and stabilized temperature (80 °C) in two consecutive steps, using KOH followed by H₂SO₄ as catalysts. In the first step, the ethanol (1 mL, 24 mmol) and the triglyceride (1 g, 1.2 mmol) were heated at 80 °C in the presence of KOH (12 mg, 0.2 mmol) for 30 min. Subsequently, a solution of H₂SO₄ (4.4 µL, 0.8 mmol) in ethanol (0.7 mL, 12 mmol) was added to the reaction mixture, which was kept at the same temperature for 2.5 h. After this period, the reaction mixture was removed from the reflux system and concentrated using a rotary evaporator to remove ethanol excess. The solution was solubilized in hexane (5 mL) and washed with water (2 x 2.5 mL). The organic phase was separated, and, then, concentrated under reduced pressure.

4.2.7 Fatty acid composition analysis in GC

The fatty esters mixture composition was determined in a 2010 Shimadzu gas chromatograph equipped with a flame ionization detector, AOC 20i auto-sampler and OV CARBOWAX 20 M (30 m x 320 µm x 0,25 µm). The initial oven temperature was maintained at 40 °C for 2 min and was subsequently increased to 230 °C with a heating rate of 10 °C min⁻¹ and kept for 7 min. A volume of 1 µL was automatically injected in split mode. Helium was used as the carrier at a 2.5 mL.min⁻¹ flow.

4.2.8 Statistical analysis

All the determinations were repeated at least two or three times and results were evaluated using the SISVAR software and the average comparison Tukey (p < 0.05) test.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 4.1 shows the biomass growth curves (g.L⁻¹) of the microalgae *Scenedesmus* sp. in different cultivation conditions. In all dilutions, the concentration of microalgae increased gradually throughout the period considered. The cultures showed maximum biomass concentrations of 1.12 ± 0.09 g.L⁻¹ for TW25%, 1.58 ± 0.07 g.L⁻¹ for TW50%, 1.75 ± 0.09 g.L⁻¹ for TW100% and 1.20 ± 0.08 g.L⁻¹ for the control condition.

When *Scenedesmus* sp. was cultivated in tannery effluent, the values microalga growth were higher (TW50% and TW100%) or similar (TW25%) to microalga growth in modified Guillard medium (control). This indicates that the tannery wastewater itself has valuable compounds necessary for the growth of microalgae without external nutrient additions.

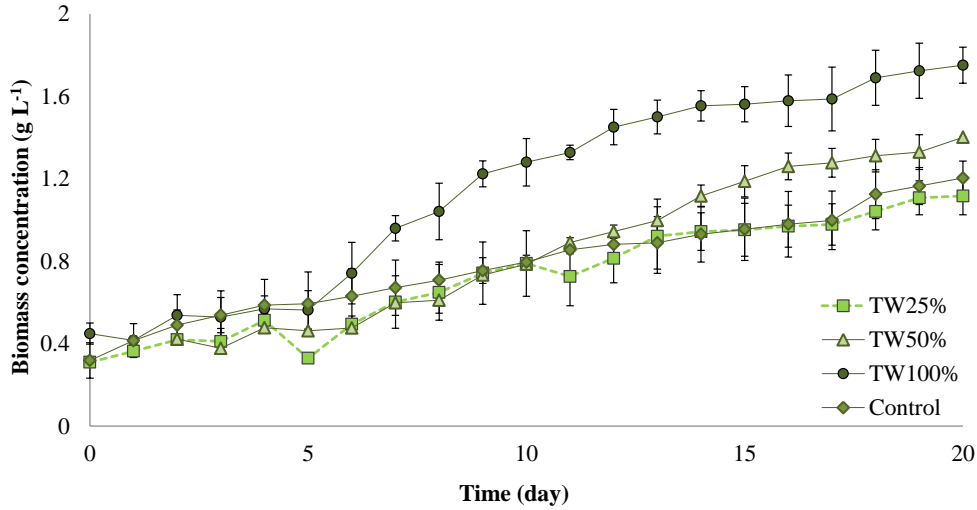


Fig. 4.1 Biomass growth curves for *Scenedesmus* sp. over time, for culture conditions with dilutions of 25% (TW25%), 50% (TW50%) and 100% (TW100%) of tannery wastewater and control.

Table 4.1 shows the mean values of the main kinetic parameters (X_{max} , μ , P_{aver} and P_{max}) determined for the different microalgae cultures. The cultivation condition TW100% resulted in higher biomass concentration ($1.75 \pm 0.09 \text{ g.L}^{-1}$), higher specific growth rate ($0.64 \pm 0.10 \text{ d}^{-1}$), higher average productivity ($0.09 \pm 0.02 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and higher maximum productivity ($0.18 \pm 0.05 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) when compared to the dilutions. These results are in accordance with several studies that presented biomass concentrations between 0.82 and 1.84 (g.L^{-1}), specific growth rate between 0.943 and 0.15 d^{-1} and maximum productivity between 266 and $74 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, for different species of *Scenedesmus* [30,31,32,33].

Arbib et al. [34] cultivated the microalgae *Scenedesmus obliquus* in urban wastewater and verified maximum concentrations of biomass, specific growth rate, average and maximum productivity of $1.684 \pm 0.105 \text{ g.L}^{-1}$, $0.672 \pm 0.168 \text{ d}^{-1}$, $0.152 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $0.201 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectively. Gouveia et al. [15] verified high average productivity ($0.22 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and maximum productivity ($0.44 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) when cultivated the microalgae *Scenedesmus obliquus* in urban effluent.

Table 4.1. Parameters of microalgae growth in tannery wastewater and control medium biomass concentration (X), specific growth rate (μ), average productivity (P_{aver}), maximum productivity (P_{max}).

Growing condition	X_{max} (g.L ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	P_{aver} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	P_{max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
TW25%	1.12 ± 0.09 ^c	0.41 ± 0.08 ^b	0.07 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.02 ^a
TW50%	1.58 ± 0.07 ^b	0.47 ± 0.06 ^b	0.08 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.08 ^a
TW100%	1.75 ± 0.09 ^a	0.64 ± 0.10 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.05 ^a
Control	1.20 ± 0.08 ^c	0.45 ± 0.07 ^b	0.07 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.06 ^a

Results are the average of 3 replicates

Means followed by the same letter in a column did not differ significantly from each other, Tukey test, $p < 0.05$, F test, $p < 0.05$.

Determination of pH is a very important factor since it determines the solubility of carbon and mineral compounds in the medium, which may influence the metabolism of microalgae. Figure 4.2 shows the variation of pH in the different conditions with the batch time. Increase in pH value was observed in the cultures over time, ranging from 6.58 ± 0.38 to 7.22 ± 0.29 for TW25%, 6.59 ± 0.38 to 7.49 ± 0.36 for condition TW50% and 7.03 ± 0.23 to 7.97 ± 0.25 for TW100% culture condition. According to Lee et al. [35] the pH increase throughout the experiment can be explained due to the inorganic carbon consumption by microalgae.

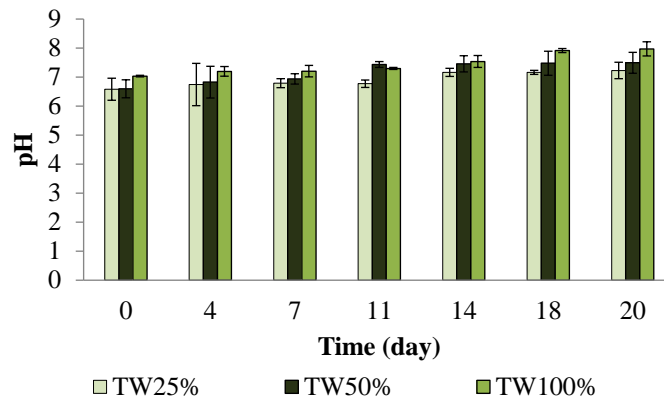


Fig. 4.2 Variation of pH in the different conditions of tannery wastewater with the culture time.

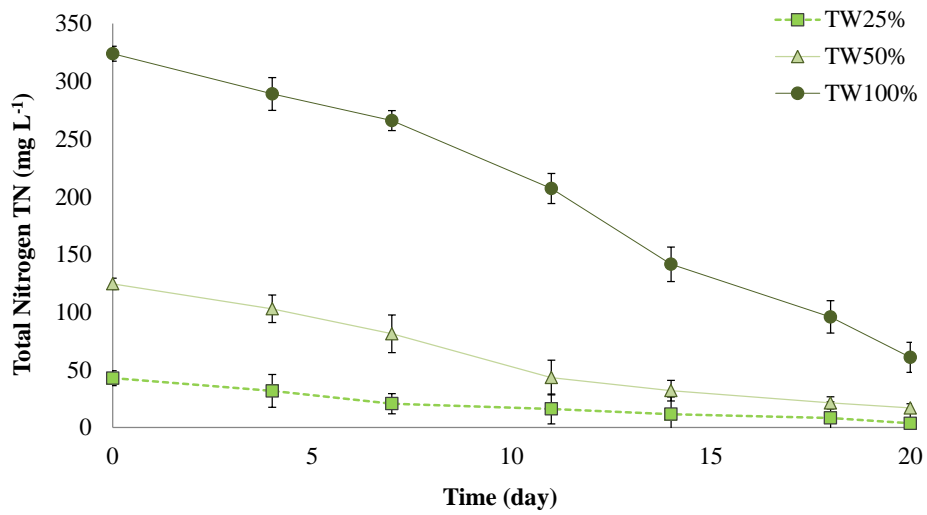
Concentrations of total nitrogen, ammoniacal nitrogen, phosphorus and inorganic carbon decreased during the batch time (Figure 4.3). Table 4.2 shows the efficiency and rate of removal of nutrients as well as the substrate conversion factor in biomass. The removal of these nutrients by microalgae is directly linked to the production of biomass and metabolic activities.

High efficiency of removal of total nitrogen above 80%, reaching a maximum level of $91.68 \pm 0.70\%$ and ammoniacal nitrogen above 83% reached a maximum level

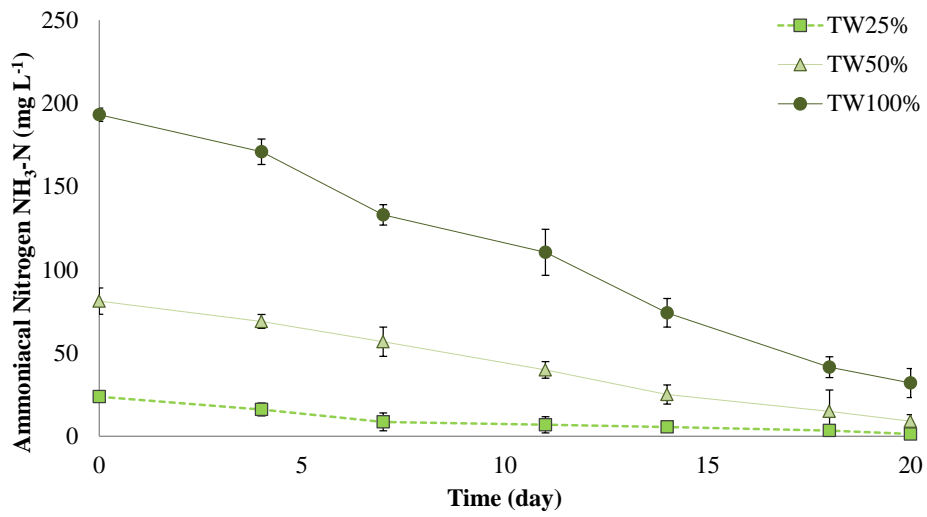
of $94.36 \pm 0.28\%$, was observed. Removal rates increased with the increase in the initial concentration of TN and $\text{NH}_3\text{-N}$, the maximum value of $13.16 \pm 0.71 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $8.14 \pm 0.31 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively, occurred in TW100% culture condition. In the same condition (TW100%) the highest conversion of substrate (total and ammoniacal nitrogen) in biomass was observed 21 ± 0.02 and $0.12 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{substrate}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biomass}}$, respectively. Nitrogen is an important macro-element for living organisms, including microalgae as a constituent that can range from 1% to 10% of the dry weight of microalgal biomass which is dependent on the amount, availability, and source of nitrogen [36]. Microalgae require this nutrient to produce important biological substances such as proteins, chlorophylls, energy transfer molecules (ADP and ATP) and genetic materials (DNA and RNA) [24]. The high ammonium removal is reinforced by the fact that if ammonium, nitrate or nitrite are present in the medium, the microalgae will mainly assimilate the ammoniacal nitrogen until depletion, and then the remaining forms, nitrite followed by nitrate [37].

Phosphorus is also an essential element for the growth of microalgae and performs a number of roles including the formation of phospholipids (for cell membranes), nucleotides (DNA biosynthesis) and nucleic acids for the growth of the microorganism and adenosine triphosphate (transport of energy for cellular functions), among other functions [38]. As shown in Figure 4.3c and Table 4.2, the microalgal cultures have high phosphorus removals, in the form of orthophosphate, with percentage of removal of more than 93%. Maximum removal rate ($0.17 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) observed was for the condition without dilution of the effluent (TW100%). Conversion of phosphorus substrate into biomass did not vary significantly in cultures of *Scenedesmus* sp. ($0.01 \text{ g}_{\text{substrate}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biomass}}$).

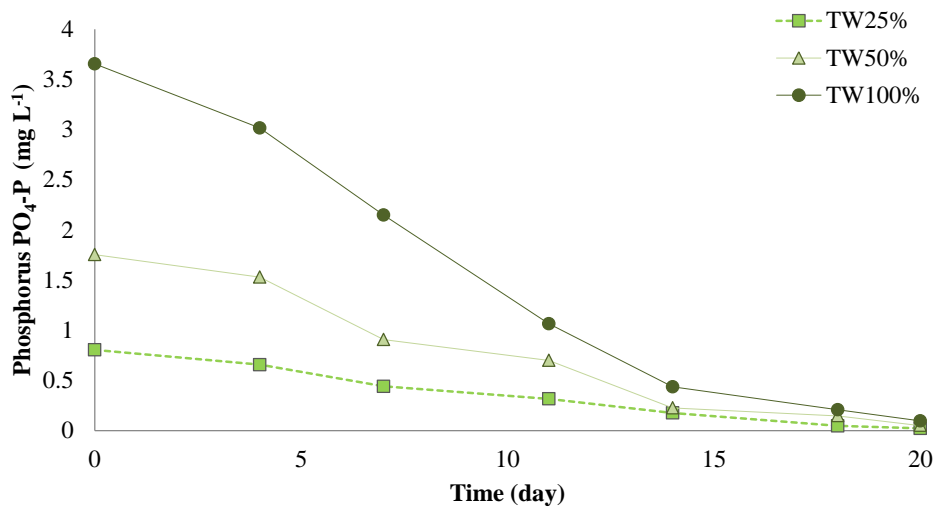
Higher removal efficiencies of up to $93.56 \pm 0.56\%$ IC were observed for growing condition (Figure 3d and Table 4.2). Removal rate of ($1.66 \pm 0.11 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and conversion of inorganic carbon substrate into biomass ($0.03 \text{ g}_{\text{substrate}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biomass}}$) maximum were observed for condition TW100%. Its high demand derived from the fact that carbon is the most important component of all the organic substances synthesized by cells such as proteins, carbohydrates, nucleic acids, vitamins, lipids, among others [38].



(a)



(b)



(c)

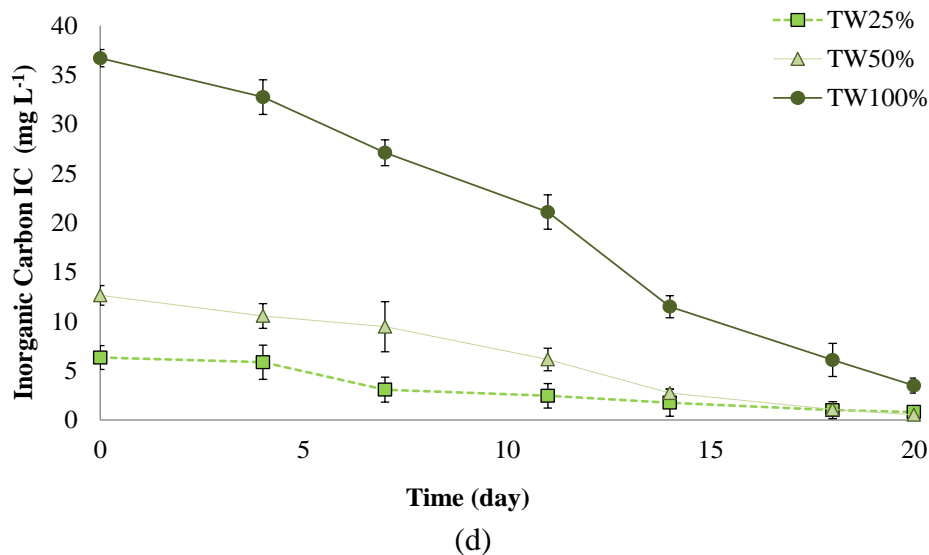


Fig. 4.3 Concentrations of (a) Total Nitrogen (TN), (b) Ammonia Nitrogen (NH₃-N), (c) Phosphorus (PO₄-P) and (d) Inorganic Carbon (IC) in the different culture conditions of microalgae *Scenedesmus* sp., over time.

Removals between $66.64 \pm 3.34\%$ and $52.08 \pm 5.35\%$ of COD (Figure 4.4 and Table 4.2) and $31.06 \pm 3.39\%$ and $27.22 \pm 1.22\%$ of BOD (Figure 4.5 and Table 4.2) were observed for growing conditions. High removal rate of $43.94 \pm 3.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $23.33 \pm 2.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and conversion of substrate into biomass were verified for the condition TW100%, for the COD and BOD parameters, respectively.

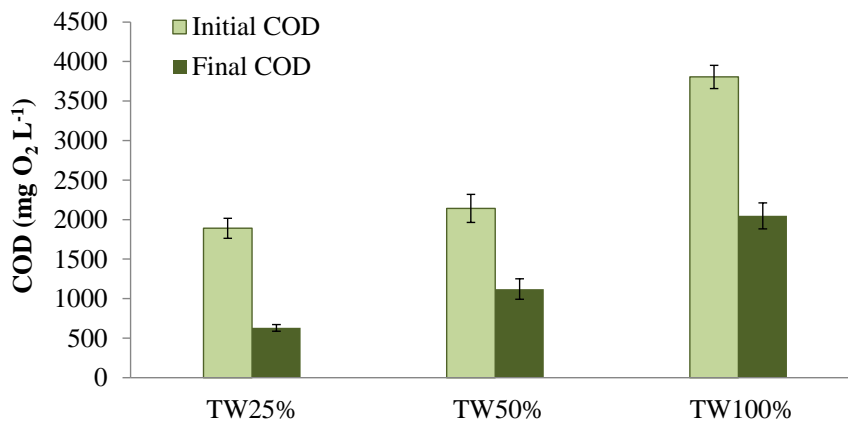


Fig. 4.4 Initial (before treatment) and final (after treatment) concentrations of chemical oxygen demand (COD) in the different culture conditions of *scenedesmus* sp.

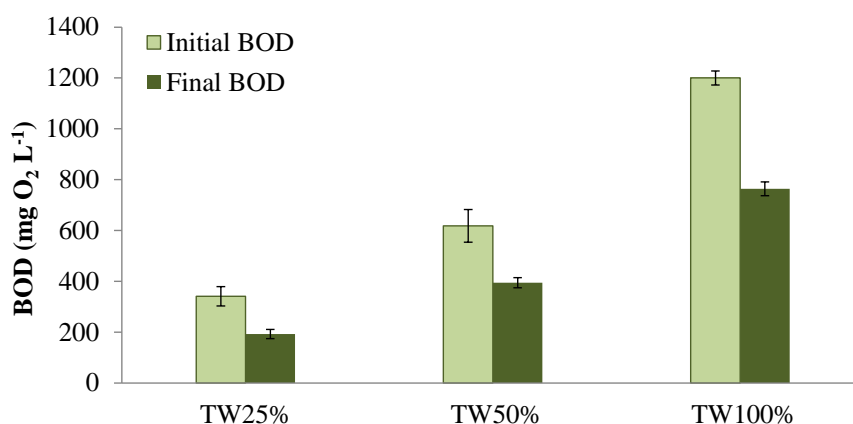


Fig. 4.5 Initial (before treatment) and final (after treatment) concentrations of biological oxygen demand (BOD) in the different culture conditions of *Scenedesmus* sp.

Table 4.2. Removal efficiency (RE), removal rate (RR) and substrate conversion factor in biomass (Y) of nutrients uptake by microalgae in the different growing conditions.

Nutrient	Growing condition			
		TW25%	TW50%	TW100%
TN	RE (%)	91.68 ± 0.70 ^a	86.49 ± 5.99 ^{ab}	80.89 ± 6.50 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	1.95 ± 0.27 ^c	5.38 ± 0.16 ^b	13.16 ± 0.71 ^a
	Y (g _{substrate} .g ⁻¹ biomass)	0.05 ± 0.01 ^c	0.09 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.02 ^a
NH ₃ -N	RE (%)	94.36 ± 0.28 ^a	88.79 ± 4.81 ^b	83.44 ± 2.93 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	1.12 ± 0.09 ^c	3.60 ± 0.59 ^b	8.14 ± 0.31 ^a
	Y (g _{substrate} .g ⁻¹ biomass)	0.03 ± 0.01 ^c	0.06 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^a
PO ₄ -P	RE (%)	97.33 ± 1.35 ^a	97.14 ± 2.47 ^a	93.09 ± 0.27 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	0.04 ^c	0.08 ^b	0.17 ^a
	Y (g _{substrate} .g ⁻¹ biomass)	0.01 ^a	0.01 ^a	0.01 ^a
IC	RE (%)	92.03 ± 0.85 ^a	93.56 ± 0.56 ^a	82.78 ± 0.81 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	0.27 ± 0.08 ^c	0.61 ± 0.06 ^b	1.66 ± 0.11 ^a
	Y (g _{substrate} .g ⁻¹ biomass)	0.01 ^b	0.01 ^b	0.03 ^a
COD	RE (%)	66.64 ± 3.34 ^a	57.85 ± 4.19 ^b	52.08 ± 5.35 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	25.53 ± 1.17 ^b	30.43 ± 2.04 ^b	43.94 ± 3.43 ^a
	Y (g _{substrate} .g ⁻¹ biomass)	0.88 ± 0.03 ^b	1.34 ± 0.17 ^a	1.51 ± 0.02 ^a
BOD	RE (%)	31.06 ± 3.39 ^a	29.37 ± 4.51 ^a	27.22 ± 1.22 ^a
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	7.00 ± 0.58 ^c	13.14 ± 2.76 ^b	23.33 ± 2.14 ^a
	Y (g _{substrate} .g ⁻¹ biomass)	0.17 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.04 ^b	0.36 ± 0.05 ^a

Standard deviation less than 10⁻² were not presented

Results are the average of 3 replicates

Means followed by the same letter in a column did not differ significantly from each other, Tukey test, p < 0.05, F test, p < 0.05.

High removals of total nitrogen and phosphorus were also observed by Jia et al. [14] when they cultivated the microalgae *Scenedesmus* sp. in the Digested Anaerobic Wastewater (ADWW), obtaining mean removal of 84.24% for TN and de 79.74% for TP. Gouveia et al. [15] cultivated the microalgae *Scenedesmus Obliquus* in urban

wastewater after primary treatment. The authors verified high removals of nitrogen (95%), phosphorus (92%) and COD (63%). In a previous study, Sacristán et al. [39] cultivated the *Scenedesmus acutus* in municipal effluent. In these study maximum percentages of removals of orthophosphate 66.2%, nitrates 71.1%; ammoniacal nitrogen 93.6% and COD 77.3% were reached in the cultures using municipal effluent before treatment.

The results obtained for the biochemical characterization of the biomass of microalgae *Scenedesmus* sp. grown under different conditions TW25%, TW50%, TW100% and control are presented in Table 4.3 and are expressed as dry weight percentages. The carbohydrate and lipid contents present in the microalgae biomass grown in the modified Guillard medium (control condition) are similar to the biomass contents of the microalgae grown in the raw wastewater without dilution.

Table 4.3. Composition of the microalgal biomass

Growing condition	Composition (%)		
	Protein	Carbohydrates	Lipids
TW25%	13.71 ± 1.17 ^c	34.17 ± 0.19 ^a	27.14 ± 0.65 ^a
TW50%	24.22 ± 1.22 ^b	29.99 ± 1.58 ^b	20.65 ± 1.11 ^b
TW100%	26.12 ± 0.39 ^b	22.48 ± 1.32 ^c	18.92 ± 0.78 ^b
Control	30.06 ± 0.88 ^a	25.52 ± 0.79 ^c	17.17 ± 1.23 ^b

Results are the average of 3 replicates

Means followed by the same letter in a column did not differ significantly from each other, Tukey test, $p < 0.05$, F test, $p < 0.05$.

Higher protein contents were observed for the microalgae grown in raw wastewater without dilution - TW100% (26.12 ± 0.39%). This can be explained by the high availability of nitrogen present in the culture medium.

Although there is a large variation in protein levels among the works reported in the literature, for cultures grown under different conditions, the values are in agreement with those reported by Arbib et al. [34] 16%, Martinez et al. [40] 11.8% and Ruiz et al. [41] 19 - 37% for the same microalgae specie.

The limitation of nitrogen concentration can reduce the protein synthesis by almost one order of magnitude [39], which explains the reduced value (13.71 ± 1.17%) of the protein content in the biomass of TW25% condition. Conversely, the limitation of this nutrient leads to an accumulation of lipids and/or carbohydrates since carbon is accumulated in the form of triacylglycerols and reserve sugars within the cells [42].

High carbohydrate content was observed for the TW25% culture condition of

34.17 ± 0.19%, which is in agreement with Miranda et al. [43], Ho et al. [44] and Batista et al. [45], that reported maximum carbohydrate levels of 45%, 39% and 43%, respectively, when they cultured the microalgae *Scenedesmus* in culture media with nutritional stress. High carbohydrate content in microalgae is a positive factor in relation to the potential use of biomass as a source of carbon for the production of hydrogen or ethanol [46].

In this study, high lipid contents (27.14 ± 0.65%) were verified for TW25% biomass. According to Li et al. [47], there is a high lipid accumulation when the cells are under conditions of physiological stress (nutrient limitation) or during the stationary phase (representing up to 15% more than during an exponential phase). Similar to the results obtained in this work, Arbib et al. [34], Sacristán et al. [39], Zhang et al. [48], also verified high levels of lipids for different species of *Scenedesmus*. In a study conducted by Sacristán et al. [39] the lipid content obtained was 28% for *Scenedesmus acutus*. Lipid contents up to 36.06% were observed by Zhang et al. [48], when they cultivated the *Scenedesmus obliquus* in urban effluent with optimized conditions.

Table 4.4 shows the average productivity of the proteins, carbohydrates and lipids of the microalgae *Scenedesmus* sp. in the growing conditions TW25%, TW50% and TW100%. Higher productivity of protein 22.85 ± 0.34 mg.L⁻¹.d⁻¹ was verified for the TW100% culture condition. Carbohydrate productivity presented maximum levels of 22.37 ± 1.34 mg.L⁻¹.d⁻¹ and 19.67 ± 1.15 mg.L⁻¹.d⁻¹ for TW50% and TW100% culture conditions, respectively.

No significant difference was observed in the lipid productivity between the different cultures in the tannery wastewater. The cultivation condition TW100% presented high lipid productivity (16.75 ± 0.76 mg.L⁻¹.d⁻¹). In this condition, the lowest lipid content (18.92 ± 0.78%) was observed in the biomass of the cultures in tannery effluent, however, a high biomass concentration of 1.75 ± 0.09 g.L⁻¹ resulted in a high lipid productivity.

Productivity is an interesting parameter to be evaluated, since it has been argued that microalgae with fast growth is success for cultures targeting products such as biofuels. The high concentration of biomass increases the yield per volume of lipids and decreases the cost, besides reducing the contamination due to external competition with slower microorganisms [49,50].

Table 4.4. Productivity in carbohydrates, proteins and lipids of the microalgae *Scenedesmus* sp. in the different culture conditions

Growing condition	Productivity (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)		
	Protein	Carbohydrates	Lipids
TW25%	7.68 ± 0.66 ^c	19.13 ± 0.11 ^b	15.16 ± 0.33 ^a
TW50%	19.13 ± 0.96 ^b	22.37 ± 1.34 ^a	16.09 ± 1.03 ^a
TW100%	22.85 ± 0.34 ^a	19.67 ± 1.15 ^{ab}	16.75 ± 0.76 ^a
Control	18.04 ± 0.53 ^b	15.31 ± 0.47 ^c	10.33 ± 0.69 ^b

Results are the average of 3 replicates

Means followed by the same letter in a column did not differ significantly from each other, Tukey test, $p < 0.05$, F test, $p < 0.05$.

The dominant fatty acids compositions of the four culture conditions of microalgae *Scenedesmus* sp. are shown in Table 4.5. In order to compare in Table 4.5 also fatty acids compositions of soy, tallow and palm are presented. It was found that the fatty acid compositions of microalgae differ from condition to condition. Although the content of unidentified fatty acids was quite significant, the results obtained suggest that the lipids profile of microalgae grown in tannery effluent are composed mainly of unsaturated fatty acids with a significant percentage (24.16 - 29.60%) of linoleic acid (C18:2). The dominant saturated fatty acid in these conditions (TW25%, TW50%, TW100%) was the palmitic acid (C16:0) (9.89 – 15.99%).

Unlike the culture in tannery effluent, the biomass of the control condition showed a major composition of saturated fatty acid, mainly composed of palmitic acid (37.98%). In the composition unsaturated fatty acids were verified higher contents of Oleic acid (12.16%) and linoleic acid (15.01%). Among unsaturated fatty acids, special attention should be given to the linolenic acid (C18:3). According to EN 14214, it is specified that for a biodiesel there is a limit of 12% of the linolenic acid (C18:3) and 1% for polyunsaturated fatty acids (≥ 4 double bonds) respectively.

The linolenic acid content of microalgal lipid was lower than 12%, ranging between 0.33% (TW100%) and 5.94% (control). Among the fatty acids identified, no polyunsaturated fatty acids with four or more double bonds were observed for all cultures.

Table 4.5. Dominant fatty acids (% of total fatty acid) composition of biodiesel of the *Scenedesmus* sp. cultivated in the tannery wastewater in the conditions TW25%, TW50%, TW100% and control and of biodiesel of soy, tallow and palm

Fatty acid (%)	TW25%	TW50%	TW100%	Control	Soy ^a	Tallow ^a	Palm ^a
(16:0)	14.75	15.99	9.89	37.98	10.5	25.2	41.6
(16:2)	8.06	8.91	19.55	-	-	-	-
(17:0)	1.67	1.67	1.50	0.85	-	1.2	0.1
(18:0)	0.55	0.23	1.79	0.39	2.0	15.7	3.2
(18:1)	16.13	16.10	7.38	12.16	24.9	42.0	41.5
(18:2)	24.16	28.26	29.60	15.01	53.4	0.8	12.0
(18:3)	4.19	4.49	0.33	5.94	4.6	0.6	0.2
(20:0)	4.51	5.07	5.86	3.83	-	-	-
Other	25.98	19.28	24.07	23.84	4.6	14.5	1.4
Saturated	21.48	22.96	19.04	43.05	12.5	40.9	44.8
Unsaturated	52.54	57.76	56.86	33.11	82.9	43.4	53.7
Poly-unsaturated	36.95	41.66	49.48	20.95	58.00	1.40	12.2

(16:0) Palmitic acid, (16:2) Hexadecadienoic acid, (17:0) Heptadecanoic acid, (18:0) Stearic acid, (18:1) Oleic acid, (18:2) Linoleic acid, (18:3) α -linolenic acid, (20:0) Arachidic acid.

^a Source: Oliveira et al., (2013).

Oxidative stability is a biodiesel properties dependents from feedstock. Under storage conditions, unsaturated chains tend to be oxidized. Contact with ambient air and metals, exposure to sunlight, high temperature and moisture are some factors that accelerate oxidation reactions [2,51]. The greater the degree of unsaturation, the greater its susceptibility to oxidation. Tri-unsaturated chains oxidize 80 times faster than monounsaturated ones and 2 times faster than di-unsaturated.

Biodiesels obtained from *Scenedesmus* sp. lipids show linoleic acid (C18:2) contents by far lower than soy biodiesel. Even if hexadecadienoic acid (C16:2), absent in the last one, is considered, the total poli-unsaturated content is still lower. On the other hand, saturated chains tends to forms wax crystals at low temperatures, which can clog fuel lines and filters in a vehicle fuel system. Biodiesels made from tallow and palm oil, unlike soy biodiesel, are highly saturated, and show poor cold filter plugging point (CFPP). Microalgae lipids cultivated in tannery effluent presented lower levels of palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) than tallow or palm oil.

4.4 CONCLUSION

This study showed the potential of *Scenedesmus* sp. for biomass production and simultaneous nutrient removal from tannery wastewater, without pretreatment and without added nutrients. The cultivation condition TW100% (without wastewater

dilution) showed the highest biomass concentration (1.75 g.L^{-1}) and the highest nutrient removal rates ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) TN (13.16 ± 0.71), $\text{NH}_3\text{-N}$ (8.14 ± 0.31), $\text{PO}_4\text{-P}$ (0.17), IC (1.66 ± 0.11), COD (43.94 ± 3.43), and BOD (23.33 ± 2.14). Higher productivity of protein ($22.85 \pm 0.34 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), carbohydrates ($19.67 \pm 1.15 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and lipids ($16.75 \pm 0.76 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), were also observed for this condition. Tannery effluent can be used as an alternative source of nutrients for the production of microalgae biomass, linking the wastewater treatment process with the production of biofuels.

4.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the study grant and Financier of Studies and Projects (FINEP) in the Project Ref. 1097/13 approved the MCTI/FINEP CT-HYDRO 01/2013.

4.6 REFERENCES

- [1] I.R. Rawat, R.T. Kumar, M.F. Bux, Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production, *Appl. Energy* 103 (2013) 444-467.
- [2] D.M. Oliveira, D.P. Ongaratto, L.A.M. Fontoura, F.F. Naciuk, V.O.B. Santos, J.D. Kunz, M.V. Marques, A.O. Souza, C.M.P. Pereira, D. Samios, Obtenção de biodiesel por transesterificação em dois estágios e sua caracterização por cromatografia gasosa: óleos e gorduras em laboratório de química orgânica, *Quim. Nova* 36 (2013) 734-737.
- [3] M. Gutterres, J. Benvenuti, J.T. Fontoura, S. Ortiz-Monsalve, Characterization of Raw Wastewater from Tanneries, *J. Soc. Leath. Tech. Ch.* 99 (2015) 280–287.
- [4] J.P. Hernandez, L.E. De-Bashan, Y. Bashan, Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 190–198.
- [5] J. Shi, B. Podola, M. Melkonian, Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study, *J. Appl. Phycol.* 19 (2007) 417–423.
- [6] E.J. Olguín, S. Galicia, G. Mercado, T. Pérez, Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J. Appl. Phycol.* 15 (2003) 249–57.
- [7] X. Zeng, X. Guo, G. Su, M.K. Danquah, S. Zhang, Y. Lu, Y. Sun, L. Lin, Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renew Sust. Energ. Rev.* 42 (2015) 1385–1392.
- [8] E.M. Grima, E.H. Belarbi, F.G.A. Fernandez, A.R. Medina, Y. Chisti, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20 (2003) 491–515.
- [9] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 294–306.

- [10] Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances, *Plant. J.* 54 (2008) 621–639.
- [11] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14 (2010) 557–577.
- [12] S. Cho, T.T. Luong, D. Lee, Y.K. Oh, T. Lee, Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 8639–8645.
- [13] L. Wang, Y. Li, P. Chen, M. Min, A. Sealock, Y. Chen, R.R. Ruan, Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp., *Bioresour. Technol.* 101 (2010a) 623–2628.
- [14] Q. Jia, W. Xiang, F. Yang, Q. Hu, M. Tang, C. Chen, G. Wang, S. Dail, H. Wu, H.J. Wu, Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 727–736.
- [15] L. Gouveia, S. Graça, C. Sousa, L. Ambrosano, B. Ribeiro, E.P. Botrel, P. Castro Neto, A.F. Ferreira, C.M. Silva, Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations, *Algal Res.* 16 (2016) 167–176.
- [16] K. Dunn, B. Maart, P. Rose, *Arthrospira (Spirulina)* in tannery wastewaters. Part 2: evaluation of tannery wastewater as production media for the mass culture of *Arthrospira* biomass. *Water S.A.* 39 (2013) 279–284.
- [17] H.P. Rao, R. Ranjith Kumar, B. Raghavan, V. Subramanian, V. Sivasubramanian, Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility, *Water S.A.* 37 (2011) 7–14.
- [18] S. Jaysudha, P. Sampathkumar, Nutrient removal from tannery effluent by free and immobilized cells of marine microalgae *Chlorella salina*, *Int. J. Environ. Biol.* 4 (2014) 21–26.
- [19] S. Balaji, T. Kalaivani, B. Sushma, P.C. Varneetha, M. Shalini, C. Rajasekaran, Characterization of sorption sites and differential stress response of microalgae isolates against tannery effluents from Ranipet industrial area—an application towards phycoremediation, *Int. J. Phytoremediation.* 18 (2016) 747-753.
- [20] K.V. Ajayan, M. Selvaraju, P. Unnikannan, P. Sruthi, Phycoremediation of tannery wastewater using microalgae *Scenedesmus* species, *Int. J. Phytoremed* 17 (2015) 907–916.
- [21] C. Das, K. Naseera, A. Ram, R.M. Meena, N. Ramaiah, Bioremediation of tannery wastewater by a salt-tolerant strain of *Chlorella vulgaris*, *J. Appl. Phycol.* (2016) 1-9.
- [22] A.L. Gonçalves, M. Simões, J.C.M. Pires, The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Convers. Manag.* 85 (2014) 530–536.
- [23] American Public Health Association (APHA) Standard methods for the Examination of water and wastewater, 21th ed, Washington DC, 2005.
- [24] N.F.P. Silva, A.L. Gonçalves, F.C. Moreira, T.F.C.V. Silva, F.G. Martins, M.C.M. Alvim-Ferraz, R.A.R. Boaventura, V.J.P. Vilar, J.C.M. Pires, Towards sustainable

microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study, *Algal Res.* 11 (2015) 350–358.

[25] M. Wang, M.C. Kuo-Dahab, S. Dolan, C. Park, Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment, *Bioresour. Technol.* 154 (2014) 131–137.

[26] E. Bligh, W. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.

[27] H.H. Ho, C.Y. Chen, K.L. Yeh, W.M. Chen, C.Y. Lin, J.S. Chang, Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates, *Biochem. Eng. J.* 53 (2010) 57–62.

[28] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.

[29] R. Guzzato, D. Defferrari, Q.B. Reiznautt, I.R. Cadore, D. Samios Transesterification double step process modification for ethyl ester biodiesel production from vegetable and waste oils, *Fuel* 92 (2012) 197–203.

[30] M.G. De Morais, J.A.A. Costa, Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, *J. Biotechnol.* 129 (2007a) 439–445.

[31] L. Rodolfi, G.C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 100–112.

[32] C. Yoo, S.Y. Jun, J.Y. Lee, C.Y. Ahn, H.M. Oh, Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 71–74.

[33] S. Mandal, N. Mallick, Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 281–291.

[34] Z. Arbib, J. Ruiz, P. Álvarez-Díaz, C. Garrido-Pérez, J.A. Perales, Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Res.* 49 (2014) 465–474.

[35] B.D. Lee, W.A. Apel, M.R. Walton, Calcium carbonate formation by *Synemathococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synemathococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 2427–2434.

[36] A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Science Ltd. Blackwell. pp. 104–105, 2004.

[37] A.E.M. Abdelaziz, G.B. Leite, P.C. Hallenbeck, Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. *Environ. Technol.* 34 (2013) 1783–1805.

[38] T. Cai, S.Y. Park, Y. Li, Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 19 (2013) 360–369.

[39] D.A.M. Sacristán, V.M. Luna-Pabello, E. Cadena, E. Ortiz, Green microalga, *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 744–748.

- [40] M.E. Martinez, S. Sánchez, J.M. Jiménez, F. Yousfi, L. Muñoz, Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 73 (2000) 263–272.
- [41] J. Ruiz, P.D. Álvarez-Díaz, Z. Arbib, C. Garrido-Pérez, J. Barragán, J.A. Perales, Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: Prediction from a batch experiment. *Bioresour. Technol.* 127 (2013) 456–463.
- [42] G. Breuer, P. Lamers, D.E. Martens, R.B. Draaisma, R.H. Wijffels, The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour. Technol.* 124 (2012) 217–226.
- [43] J.R. Miranda, P.C. Passarinho, L. Gouveia, Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 555–564.
- [44] S.H. Ho, C.Y. Chen, J.S. Chang, Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N, *Bioresour. Technol.* 113 (2012) 244–252.
- [45] A.P. Batista, L. Ambrosano, S. Graça, C. Sousa, P.A.S.S. Marques, B. Ribeiro, E.P. Botrel, P. Castro Neto, L. Gouveia, Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production - An integrated microalgae-based approach. *Bioresour Technol* 184 (2015) 230–235.
- [46] A.F. Ferreira, J. Ortigueira, L. Alves, L. Gouveia, P. Moura, C.M. Silva Biohydrogen production from microalgal biomass: energy requirement, CO₂ emissions and scale-up scenarios. *Bioresour. Technol.* 144 (2013) 156–164.
- [47] Y. Li, M. Horsman, B. Wang, N. Wu, Lan C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 629–636.
- [48] C. Zhang, Y. Zhang, B. Zhuang, X. Zhou, Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 171 (2014) 71–79.
- [49] M.J. Griffiths, S.T.L. Harrison, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 493–507.
- [50] M.A. Borowitzka, Algal biotechnology products and processes— matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4 (1992) 267–279.
- [51] M.M. Rashed, M.A. Kalam, H.H. Masjuki, H.K. Rashedul, A.M. Ashraful, I. Shancita, A.M. Ruhul, Stability of biodiesel, its improvement and the effect of antioxidant treated blends on engine performance and emission, *RSC Advances* 46 (2015) 36240-36261.

Capítulo 5

Simultaneous nutrient removal and lipid production from raw tannery wastewater by *Chlorella* sp.

Artigo enviado para publicação no periódico: *Clean Technologies and Environmental Policy* (CTEP) em 21/07/2017.

Status: under review

Neste estudo foi investigada a capacidade da *Chlorella* sp. em absorver nutrientes tais como nitrogênio, fósforo e carbono inorgânico para a produção de biomassa. Os cultivos da microalga foram realizados em fotobiorreatores *airlift* de 3 L nas diluições de 25%, 50% e 100% de efluente de curtume bruto sem tratamento prévio, com luminosidade e aeração constante. Este estudo inclui a caracterização da biomassa em carboidratos, proteínas e lipídios, bem como a composição dos teores de ácidos graxos do biodiesel produzido a partir dos lipídios da microalga.

Simultaneous nutrient removal and lipid production from raw tannery wastewater by *Chlorella* sp.

Juliana Tolfo da Fontoura^{1*}, Marcelo Farenzena² and Mariliz Gutterres¹

¹Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO), ²Laboratory of Process Control and Integration (LACIP), Chemical Engineering Post-graduated Program (PPGEQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Luiz Englert s/n°, Porto Alegre-RS, Brazil, 90040-040, (51)3308-3954, jutolfo@enq.ufrgs.br, mariliz@enq.ufrgs.br

Abstract

Using wastewater as resource for microalgal cultivation is considered as a low-cost and eco-friendly approach for sustainable biofuel production. Thus, this study aimed the coupling of the treatment of tannery wastewater with the viability of biodiesel production from the biomass of the microalga *Chlorella* sp. The microalgae *Chlorella* sp. was cultured in different dilutions tannery wastewater without pretreatment and without addition of nutrients for 20 days. Nutrients removal, biomass growth, lipid production and composition of fatty acid were evaluated. Ammoniacal nitrogen removal efficiency was observed to be $90.68 \pm 2.78\%$, total nitrogen $88.10 \pm 3.53\%$, phosphorus $98.10 \pm 0.51\%$, inorganic carbon $89.46 \pm 2.45\%$, BOD $37.87 \pm 1.69\%$ and COD $71.21 \pm 2.24\%$. Since microalgae assimilate nutrients from wastewater for growth, maximum increment in the biomass of $1.31 \pm 0.04 \text{ g.L}^{-1}$ was observed. The higher lipid productivity ($16.99 \pm 1.01 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and the higher content of saturated fatty acids (69.35%) were verified for the culture without dilution. The FAEE obtained in this condition exhibited the greatest oxidative stability, as the degree of saturation was high. This study demonstrated that the coupling of nutrient removal and microalgal biomass generation enables greener and low-cost routes for synthesis biofuels.

Keywords: Tannery Wastewater treatment, *Chlorella* sp., biomass production, biofuel.

5.1 INTRODUCTION

Nowadays biodiesel, like other biofuels, is a reality and its production and consumption is growing worldwide. Demand of energy and related environmental issues like generation of pollutants and global warming have given a strong impetus to the development of sustainable and eco-friendly (clean) energy sources to fossil fuel for supporting modern societies. Biodiesel as a renewable energy source, has advantages over petroleum diesel, because it is biodegradable, non-toxic and presents better quality of the emissions during the combustion process, as it is free of sulfur and aromatic compounds (Choi et al. 2015; Mostafa and El-Gendy, 2017). Biofuels can be produced from different renewable sources such as soybean, canola, palm, cotton, microalgae, bovine tallow, pork fat and others.

Under this concept, the use of raw tannery wastewater for microalgae cultivation can reduce environmental degradation while generating biomass of interest to the biofuels industry.

Microalgae can be serving as a potential biomass resource for the production of biodiesel due to their high growth rate, environmental adaptability, and high biomass production yield per area (Ellis et al. 2012). Nutrients for microalgae can be supplied when they are cultured in wastewater which eliminates fertilizer and herbicide requirements and the pollution effects associated with them (Mata et al. 2010), microalgae sequester enormous amount CO₂, converting the CO₂ into biomass, and contributing to mitigating greenhouse gases (Van et al. 2012; Lam and Lee, 2012;). Algae cultivation does not compete with food crops because algae can use arid lands that are not suitable for crops (Chisti, 2007; Uduman et al. 2010). In addition the residual algae biomass after oil extraction can be used a fertilizer or fermented to produce alcohol (Mata et al. 2010).

Nevertheless, microalgal biodiesel production at a commercial scale is yet unattainable mainly due to its high costs. Nutrients and fresh water contribute up to 50% of the total biomass production cost that eventually impact the economical feasibility of algal fuels (Sing and Das, 2014; Slade and Bauen, 2013). Growing algae in wastewater offers numerous economic and environmental merits, providing one of the most sustainable ways to produce biodiesel derived from microalgae. Wastewater usage eliminates competition for fresh water, reduce the cost of nutrient addition since nutrients are in abundance in wastewater, provides the treatment of the wastewater by assimilating organic and inorganic pollutants into their cells forming a biomass of commercial (Chinnasamy et al. 2010; Samori et al. 2013; Wang et al. 2010).

Some studies have demonstrated the feasibility of utilization of wastewater as the nutrient source for the cultivation of microalgae (Li et al. 2011a, b; Wang et al. 2010; Jia et al. 2016; Zhu et al. 2013).

A wastewater of particular interest is the effluent obtained through beamhouse stage from the leather processing. The beamhouse incorporates several different processes which include the addition of chemical products aimed at removing undesirable materials from the hide, cleaning and preparing the hide for the tanning step. The effluents from this stage are characterized by high residual organic loads as well as the presence of nitrogenous compounds. Thus, the aim of this work was to explore the potential production of biodiesel from microalgae grown in tannery

wastewater by investigating the nutrients removal, biomass growth, the simultaneous lipid accumulation as well as composition of fatty acid.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Microalgae and Effluent

Microalgae *Chlorella* sp. was grown with TAP medium with 12:12 h cyclic illumination at $80 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensity at $27 \text{ }^\circ\text{C}$ in 250 mL Erlenmeyer flasks. The TAP medium consists of: $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (2420 mg.L^{-1}), NH_4Cl (375 mg.L^{-1}), $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (100 mg.L^{-1}), $\text{CaCl}_2 .2\text{H}_2\text{O}$ (50 mg.L^{-1}) K_2HPO_4 (28.8 mg.L^{-1}), KH_2PO_4 (14.4 mg.L^{-1}), $\text{Na}_2\text{EDTA}.2\text{H}_2\text{O}$ (50.0 mg.L^{-1}), $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (22.0 mg.L^{-1}), H_3BO_3 (11.4 mg.L^{-1}) $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ (5.0 mg.L^{-1}), $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (5.0 mg.L^{-1}), $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ (1.6 mg.L^{-1}), $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ (1.6 mg.L^{-1}), $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_3$ (1.1 mg.L^{-1}), CH_3COOH (1 mL.L^{-1}). Atmospheric air was continuously supplied at 1 L min^{-1} flow rate. The growth until the exponential phase culture served as the inoculum.

5.2.2 Source of wastewater

The experiments were conducted using raw tannery wastewater, collected directly. The tannery wastewater was obtained from a tannery located in Montenegro, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The samples were collected directly from the beamhouse process. The wastewater consists of $7683 \pm 13.71 \text{ mg.L}^{-1}$ chlorides (Cl), $349.60 \pm 13.71 \text{ mg.L}^{-1}$ total nitrogen (TN), $200.26 \pm 1.98 \text{ mg.L}^{-1}$ ammoniacal nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$), $2.95 \pm 0.29 \text{ mg.L}^{-1}$ phosphorus ($\text{PO}_4\text{-P}$), $66.43 \pm 2.11 \text{ mg.L}^{-1}$ inorganic carbon (IC), $1200 \pm 31.88 \text{ mg.L}^{-1}$ biochemical oxygen demand (BOD) and $3946.32 \pm 52.09 \text{ mg.L}^{-1}$ chemical oxygen demand (COD). The pH of the wastewater was 7.65 ± 0.5 . The wastewater was homogenized by mechanical agitation and subsequently stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for further use.

5.2.3 Cultivation in photobioreactors

The cultures were grown in 3 L photobioreactor airlift under continuous illumination at $140 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensity at room temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), for 20 days. The air bubbled into the cultivation was supplied at 1 L.min^{-1} flow rate.

The microalgae inoculum as described in 5.2.1 accounted for 10% of the total volume of all batch cultivations, which led to an initial biomass concentration of 0.3

g.L⁻¹ as dry weight. The microalgae *Chlorella* sp. was cultivated in tannery wastewater without pretreatment under the final dilution of 1:3 (25% tannery wastewater and 75% water), 1:1 (50% tannery wastewater and 50% water) and 1:0 (100% tannery wastewater and 0% water). The microalgae were also cultured in the TAP medium, this condition was used as control. All cultures were performed in duplicate.

5.2.4 Analytical methods

Microalgae biomass was measured daily by optical density at 570 nm (OD₅₇₀) using a in a T80+UV/Vis spectrophotometer (PG Instruments). Samples with high biomass were diluted by appropriate ratios to ensure that absorbance values were in the range of 0.1-1.0. To convert the OD₅₇₀ values to biomass as dry weight X (g.L⁻¹), a calibration curve was plotted (Eq. 1). Biomass dry weight as suspended solids was determined gravimetrically according to Standard Methods (APHA 2005). Microalgae biomass was measured by filtering the samples through 0.7 µm pre-weighed membranes, which were dried at 100 °C for 24 h.

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0.3649 \times \text{OD}_{570} - 0.019 \text{ (R}^2 = 0.997\text{)} \quad (1)$$

Liquid samples for nutrient consumption analysis of total nitrogen (TN), ammoniacal nitrogen (NH₃-N), phosphorus (PO₄-P), inorganic carbon (IC) were collected during cultivation. Biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) were measured on the first day and the last day of the experiment. The parameters inorganic carbon and total nitrogen were measured using a total organic carbon analyzer (model TOC-L TNM, Shimadzu). Analyses of ammoniacal nitrogen, phosphorus, chemical oxygen demand, and biochemical oxygen demand were performed according to the methodology described by APHA (2005).

Nutrient removal rates (RR) and nutrient removal efficiency (RE) were calculated using Eqs. (2-3), respectively.

$$\text{RR (mg. L}^{-1}\text{. d}^{-1}\text{)} = \frac{(S_0 - S_i)}{(t_i - t_0)} \quad (2)$$

$$\text{RE (\%)} = \frac{(S_0 - S_i)}{S_0} \times 100 \quad (3)$$

where RR represents the removal rate of substrate, S_0 represents the initial concentration of substrate, S_i is the nutrient concentration at time t_i , t_i is the final culture time, t_0 is the initial time of cultivation.

At the end of the experiments, biomass was harvested by centrifugation at 4000 rpm for 10 min (Centrifuge Solab, model SL-705). The same procedure was repeated three times with the addition of distilled water. The pellet obtained was dried in a vacuum freeze-dryer until constant weight (THERMOSAVANT MICROMODULYO).

The total protein content in dry biomass was determined by modified Kjeldahl method (AOAC, 2005). In a Kjeldahl tube 100 mg of dried microalgae, 5 mL of distilled water 25 mL of concentrated sulfuric acid and 10 g of catalytic mixture (100 g K_2SO_4 + 3g $CuSO_4$) were added. It digested in a digestive device (Block *Digester* System DK20 *Velp Scientifica*) for 4 h. After the sample was distilled and titrated with a stock solution of H_2SO_4 (0.3 N). Crude protein was calculated by multiplying total nitrogen by the conventional conversion factor of 6.25. Lipid content of the biomass was determined according to methodology described by Bligh and Dyer (1959). In the pre-treatment of biomass, to 500 mg of lyophilized pellets, 5 ml of chloride acid 2 M was added. The solution was mixture in vortex and digested in a water bath at 80 °C for 60 min. The lipids were extracted using the solvents chloroform:methanol:water (2:2:1.8 v/v). The solution was mixture in vortex and centrifuged. Organic phase containing lipid was collected and evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator. The remainder was dried at 80 °C to constant weight. The lipid weight was calculated gravimetrically and expressed as % of dry weight. Carbohydrate extraction was performed by treating the dried microalgae biomass (20 mg) with 1 mL H_2SO_4 80% for 20 h. The total carbohydrate content was determined by the phenol-sulphuric reagent method (Dubois et al. 1956). To 1 mL of sample previously diluted (1:20) was added 1 mL of phenol solution (3% w/v) and 5 mL of 96% sulphuric acid. It rested for 30min at room temperature. The analytical curve was prepared using glucose standards and the microalgae total carbohydrate content was determined in a spectrophotometer at 490 nm. All extractions were done in triplicate.

Carbohydrate $P_{(C)}$, protein $P_{(P)}$ and lipids $P_{(L)}$ productivity, were calculated according to the Equation (4):

$$P_{(C,P,L)} = \frac{X_f \times C_{(C,P,L)}}{100 \times t_f} \quad (4)$$

where X_f is the final biomass concentration, $C_{(C,P,L)}$ the carbohydrate, protein and lipids concentration and t_f the final culture time.

5.2.5 Fatty acid analysis

Fatty acid content and composition analysis were performed by following two consecutive steps including preparation of fatty acid ethyl esters (FAEE) and GC–MS analysis. FAEE was prepared by a one-step transesterification method as described by Guzzato et al. (2012). The composition and content of FAEE was analyzed with GC (Shimadzu GC-2010) equipped with a flame ionization detector, AOC 20i auto-sampler and OV CARBOWAX 20 M (30 m x 320 μm x 0,25 μm). The oven temperature was set at 40 °C, held for 2 min, raised to 230 °C at 10 °C.min⁻¹, and held at 230 °C for 7 min. The carrier gas (helium) was controlled at 2.5 mL.min⁻¹. Chromatographic data were recorded and integrated using the built-in Agilent data analysis software. The compounds were identified in the NIST Mass Spectral Database and quantified by comparing the peak area with that of the external standard (C17:0) (Sigma–Aldrich, MO).

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

The daily monitoring of the different cultures allowed the characterization of their growth biomass and analysis of the influence of dilution of the tannery wastewater (corresponding to different wastewater:water ratio). The achieved results showed that the microalgae *Chlorella* sp. was able to use the nutrients present in the tannery wastewater, resulting in the increase of microalgal biomass. The 1:3, 1:1 and 1:0 dilution treatments showed increment in the biomass of $1.04 \pm 0.06 \text{ g.L}^{-1}$, $1.20 \pm 0.1 \text{ g.L}^{-1}$, $1.31 \pm 0.04 \text{ g.L}^{-1}$, respectively (Fig. 5.1). The control condition (microalga cultivated in TAP medium) presented a growth of $1.21 \pm 0.07 \text{ g.L}^{-1}$. In general, microalgae cultures presented the following growth behavior: (I) adaptation phase; (II) exponential or growth phase and (III) stabilization or stationary phase. For the diluted wastewater cultures (1:3 and 1:1 conditions) the lack of an adaptation phase were observed. In these conditions hang out stationary phases about 14 days and 16 days of cultivation, respectively. It could have been caused by the limitation of nutrients in the culture medium. Already in the culture without dilution of effluent (condition 1:0) an adaptation phase of 3 days was observed.

This can be explained by the large amount of chloride ($7,683 \text{ mg.L}^{-1}$) present in this effluent. Furthermore, the high concentrations of ammoniacal nitrogen may also have slowed the growth of microalgae in this condition. At the end of the cultivation, for the 1:0 culture condition, the stationary phase was not verified.

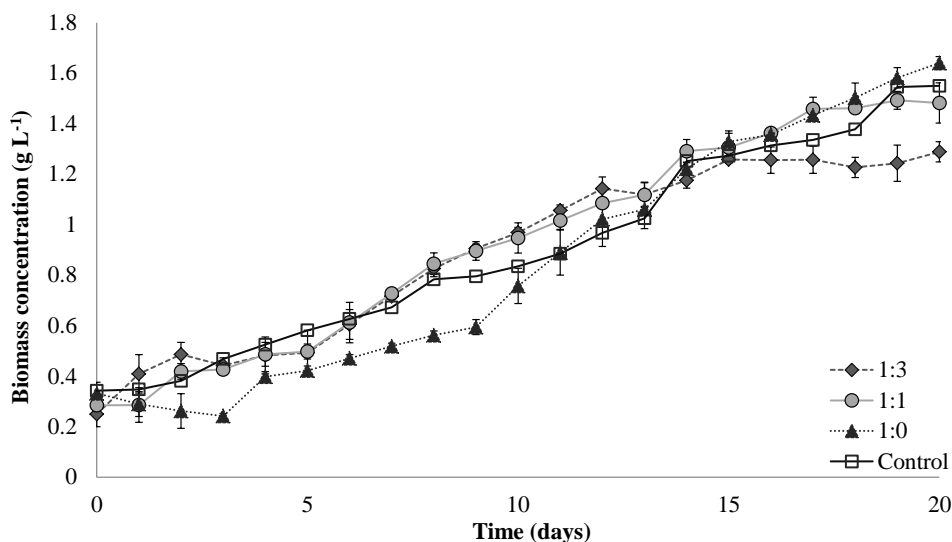


Fig. 5.1 Growth curves of *Chlorella* sp. in raw tannery wastewater under the dilutions of 1:3 (25% tannery wastewater and 75% water), 1:1 (50% tannery wastewater and 50% water), 1:0 (100% tannery wastewater and 0% water) and control (cultivated in the TAP medium).

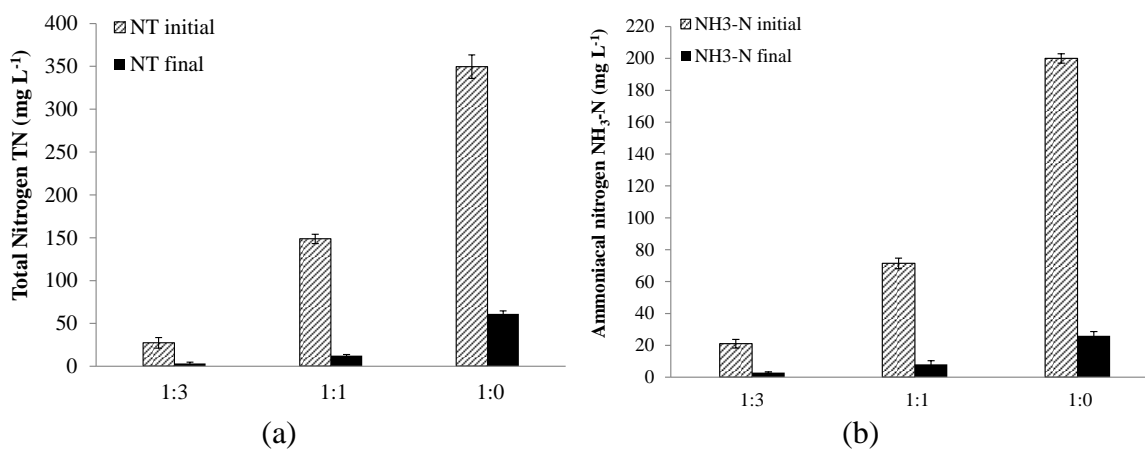
Previous studies have confirmed highly effective use of microalgae *Chlorella* sp. in removal of organics, nitrogen and phosphorus of municipal wastewater (Wang et al. 2013); dairy wastewater (Wang et al. 2010; Abreu et al. 2012); wastewater from the production of soybean products (Zhang et al. 2012), brewery wastewater (Farooq et al. 2013); piggery wastewater (Ji et al. 2013).

In this study the NT, $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ and CI content decreased significantly in cultures at different tannery effluent dilutions (1:3, 1:1, 1:0) (Fig. 5.2 and Table 5.1). Microalgae assimilate nutrients such as nitrogen, phosphates and carbon into the cells for its growth contributing to treatment of wastewater (Perez-Garcia et al. 2011). Ammonical, nitrate and nitrite are the main forms of inorganic nitrogen that are directly assimilable by for microalgae (Abdelaziz et al. 2013). Most of the nitrogen in the tannery wastewater was in the form of ammonium nitrogen, and therefore was readily available to algae.

The results evidenced around 90% removal for the ammoniacal nitrogen within the period of 20 days growth for all in tannery wastewater assays (Figure 5.2b)

independent of the initial concentration ($200.20 \pm 1.98 \text{ mg.L}^{-1}$ to $21.00 \pm 1.38 \text{ mg.L}^{-1}$). Therefore the possible toxicity or inhibition of high levels of NH_4 to the microalgae was not verified, proving the strain to be ammoniacal-N tolerant. Total nitrogen was highly reduced by $82.98 \pm 1.67 \%$ – $88.10 \pm 3.53 \%$ but not completely removed (Fig. 5.2a), indicating there were still some inorganic compounds that had not yet been assimilated by microalgae or even organic compounds that could not be converted into inorganic nitrogen. Higher rates of removal of total nitrogen ($14.42 \pm 0.85 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and ammonia nitrogen ($16.03 \pm 1.56 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) were verified for the assay without dilution of the effluent. Nitrogen is an essential macronutrient for microalgae, as it is a constituent of important biological substances, such as proteins, chlorophylls, energy transfer molecules (ADP and ATP) and genetic materials (RNA and DNA) (Cai et al. 2013).

Phosphorus is another important macronutrient, preferably uptake in the inorganic forms H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} . Some researchers demonstrated that phosphate play a major role in many cellular metabolic processes such as biosynthesis of nucleic acid, photosynthesis, energy transfer, protein synthesis, etc (Karemore et al. 2013; Cai et al. 2013). In this study, microalgal cultures presented high removal efficiencies, achieving percentage removal higher than 97% and maximum removal rate of $0.13 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ for no diluted cultivation condition (1:0). In addition, inorganic carbon in the form of soluble carbonates (HCO_3^-) was also assimilated by microalgae. Higher removal of 80% of the inorganic carbon with the highest removal rate of $3.21 \pm 0.10 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ was observed.



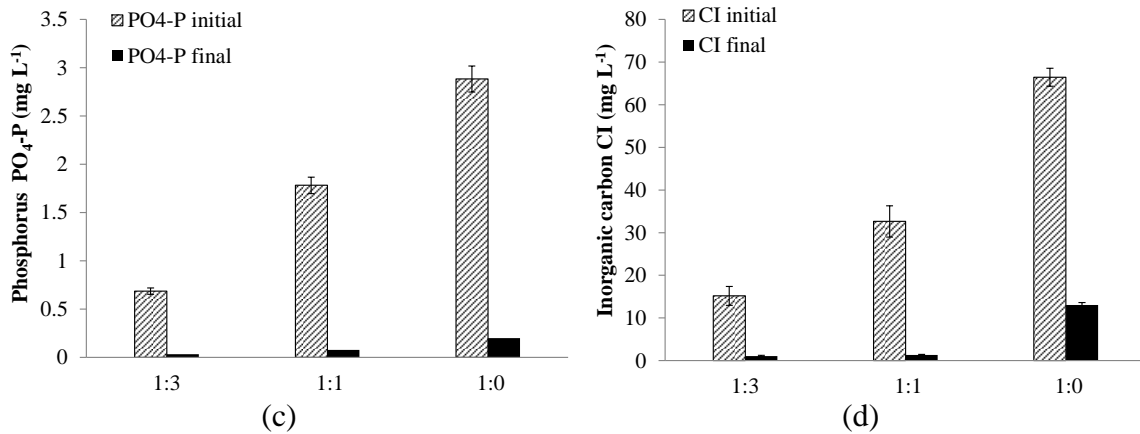


Fig. 5.2 Initial and final concentrations of (a) total nitrogen (TN), (b) ammoniacal nitrogen (NH₃-N), (c) phosphorus (PO₄-P) and (d) inorganic carbon (IC) for the growing of *Chlorella* sp. in 100% tannery wastewater (1:0) and diluted 1:3 and 1:1

The abilities of the microalga *Chlorella* sp. to assimilate organic matter in wastewater had been revealed (Li et al. 2011a; Lu et al. 2015). Thus, the removal efficiency of biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) are also parameters used to evaluate the nutrient removal property by microalgae. In this study the changes of BOD and COD concentration in the cultivations in tannery wastewater were determined and are shown in Figure 5.3. With the increments of microalgal biomass, the BOD and COD concentrations in culture solutions decreased, but not as efficient as nitrogen and phosphorus. Removal efficiencies between $29.4 \pm 1.36 \%$ and $37.87 \pm 1.69 \%$ to BOD and $66.67 \pm 2.09 \%$ and $71.20 \pm 2.24 \%$ to COD was verified. High removal rates were observed for the 1:0 dilution conditions, reaching $17.64 \pm 1.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for BOD and $134.17 \pm 2.95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for COD (Table 6.1).

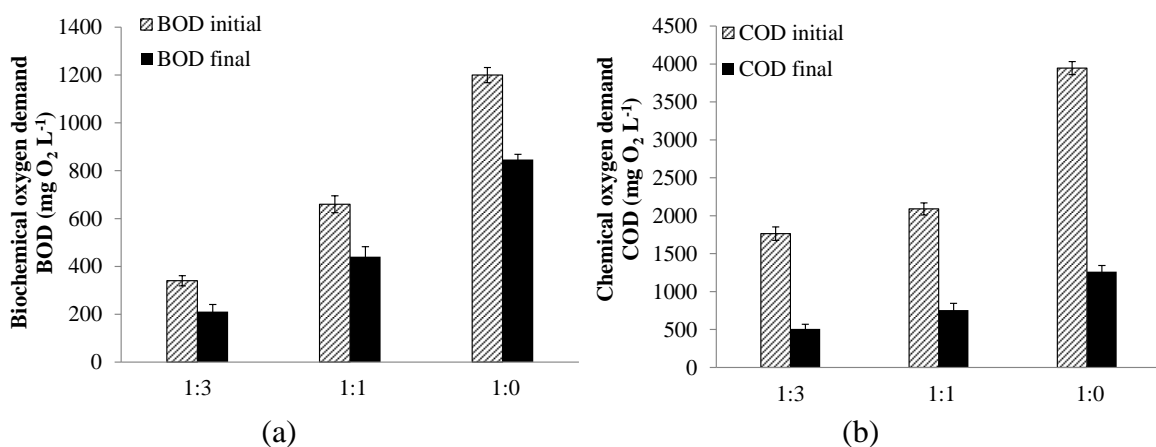


Fig. 5.3 Initial and final concentrations of (a) biochemical oxygen demand (BOD) and (b) chemical oxygen demand (COD) for the growing of *Chlorella* sp. in 100% tannery wastewater (1:0) and diluted 1:3 and 1:1

Besides the final removal efficiency (RE) of certain pollutant, the removal rate (RR) is another very important parameter, since it is directly related to the time required to reach certain removal efficiency and, therefore, would influence the growing time. However, a high culture time may cause the lysis of the microalgae cells which would release some dissolved matters that may contribute significantly to the residual COD in culture medium. In this study, high removal efficiencies of nitrogen, phosphorus and inorganic carbon was observed. Although the residual COD and BOD concentration remained high, thus suggesting the coupling of a primary treatment as a previous treatment.

Table 5.1. Removal efficiency (RE) and removal rate (RR) of nutrients uptake by microalgae in the different growing conditions.

Nutrient	Growing condition			
		1:3	1:1	1:0
TN	RE (%)	88.10 ± 3.53 ^a	85.59 ± 1.07 ^a	82.98 ± 1.67 ^a
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	1.20 ± 0.39 ^c	6.81 ± 2.58 ^b	14.42 ± 0.85 ^a
NH ₃ -N	RE (%)	90.68 ± 2.78 ^a	88.68 ± 2.31 ^a	86.73 ± 1.67 ^a
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	1.01 ± 0.31 ^c	6.95 ± 2.72 ^b	16.03 ± 1.56 ^a
PO ₄ -P	RE (%)	98.10 ± 0.51 ^a	97.92 ± 0.43 ^a	97.07 ± 0.21 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	0.03 ^c	0.08 ^b	0.13 ^a
IC	RE (%)	89.46 ± 2.45 ^a	86.00 ± 3.65 ^{ab}	80.36 ± 2.10 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	0.70 ± 0.10 ^c	1.57 ± 0.18 ^b	3.21 ± 0.10 ^a
BOD	RE (%)	37.87 ± 1.69 ^a	33.30 ± 2.25 ^b	29.40 ± 1.36 ^b
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	6.44 ± 1.27 ^b	10.98 ± 3.16 ^b	17.64 ± 1.27 ^a
COD	RE (%)	71.21 ± 2.24 ^a	66.67 ± 2.09 ^a	68.77 ± 1.89 ^a
	RR (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	62.80 ± 3.34 ^b	66.68 ± 4.56 ^b	134.17 ± 2.95 ^a

Standard deviation less than 10⁻² were not presented

Results are the average of 3 replicates

Means followed by the same letter in a column did not differ significantly from each other, Tukey test, p < 0.05, F test, p < 0.05.

After 20 days of cultivation, the protein, carbohydrate, lipid content per biomass (% , g/g, dry weight) and productivity of the four culture conditions of the microalgae (1:3, 1:1, 1:0 and control) were determined and the results were shown in Table 5.2 and Figure 5.4, respectively.

The microalgae of the same species have different amounts of proteins, carbohydrates and lipids when grown in media with different amounts of nutrients (Procházková et al. 2014). According to the obtained results it can be observed that the supplied nutrient concentrations in the medium (due to different culture conditions) had strong influence on the biochemical composition of the biomass. For the wastewater

culture conditions (different dilutions) there was a reduction of lipids and carbohydrates in the biomass with the increase of the N and P supply in the medium, giving higher protein content in this condition.

The microalgae used in this study expressed lipid contents, varied from $18.36 \pm 1.49\%$ (control condition) to $25.46 \pm 1.61\%$ (1:3 dilution condition). The lipid contents of this microalgal strain in this study are comparable with the result obtained by Beuckels et al. (2015), which cultivated *Chlorella* sp. in wastewater varying the initial concentration of N and P where the lipid content was observed between 12% and 36%. Gouveia et al. (2016) cultivated *Chlorella vulgaris* in urban wastewater and found lower lipid values (10%) in the biomass of which found in this work. Although the cultivation condition 1:0 had the lowest percentage of lipids in the biomass composition ($19.84 \pm 1.33\%$) when compared to the other culture conditions in the effluent, lipid productivity ($16.99 \pm 1.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was higher in the culture condition without dilution of the wastewater due to the higher production of biomass. The carbohydrate content values in the microalgae studied were ranged from 12.70 ± 1.4 to $34.80 \pm 1.56 \%$. These values are within the range reported by Beuckels et al. (2015) (18 to 40%), and Gouveia et al. 2016 (27.7%). High carbohydrate productivities ($22.72 \pm 1.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) were observed for the most diluted 1:3 condition. In this condition the highest carbohydrate content ($34.80 \pm 1.55\%$) was verified. Microalgae with high carbohydrate are promising raw materials for the production of bioethanol and hydrogen (Ho et al. 2013).

Regarding the protein content, a reduction of $30.09 \pm 0.96\%$ (condition without dilution, 1:0) to $7.32 \pm 0.51\%$ (condition with the highest dilution, 1:3) was observed for the microalgae cultured in the tannery effluent. Due to the high levels of proteins present in the microalgae, as well as the higher concentration of biomass under these conditions of 1:0 and control, under these conditions were observed high protein yields $24.67 \pm 0.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $24.80 \pm 0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. Restriction of essential elements such as nitrogen and phosphorus affects the overall energy strategy of microorganisms, resulting in decreased protein synthesis and accumulation of carbohydrates and/or lipids (Markou, 2012).

In the microalgal cultivation duration, starch is first synthesized to store energy and then lipids accumulate to overcome possible environment stress in long-term cultivation (Siaut et al. 2011). Lipid induction in microalgae occurs under stress conditions, such as nutrient stress (N and/or P starvation), light intensity, pH and temperature (Li et al. 2014; Sharma et al. 2012). In this study, although a higher content

of lipids was observed in the most dilute cultivation (with N and P limitations in wastewater), there was a greater productivity of lipids in the cultivation without dilution due to the high concentration of biomass in this condition, indicating as well that the lipid produced from *Chlorella* sp. cultured in untreated and undiluted tanning wastewater is applicable as the precursor for biodiesel.

Table 5.2. Composition of the microalgal biomass

Growing condition	Composition (%)		
	Protein	Carbohydrates	Lipids
1:3	7.32 ± 0.51 ^c	34.80 ± 1.56 ^a	25.46 ± 1.61 ^a
1:1	21.56 ± 1.24 ^b	16.74 ± 1.69 ^b	21.80 ± 1.98 ^{ab}
1:0	30.09 ± 0.96 ^a	17.21 ± 1.80 ^b	19.84 ± 1.33 ^b
Control	32.00 ± 1.16 ^a	12.70 ± 1.41 ^c	18.36 ± 1.49 ^b

Results are the average of 3 replicates

Means followed by the same letter in a column did not differ significantly from each other, Tukey test, $p < 0.05$, F test, $p < 0.05$.

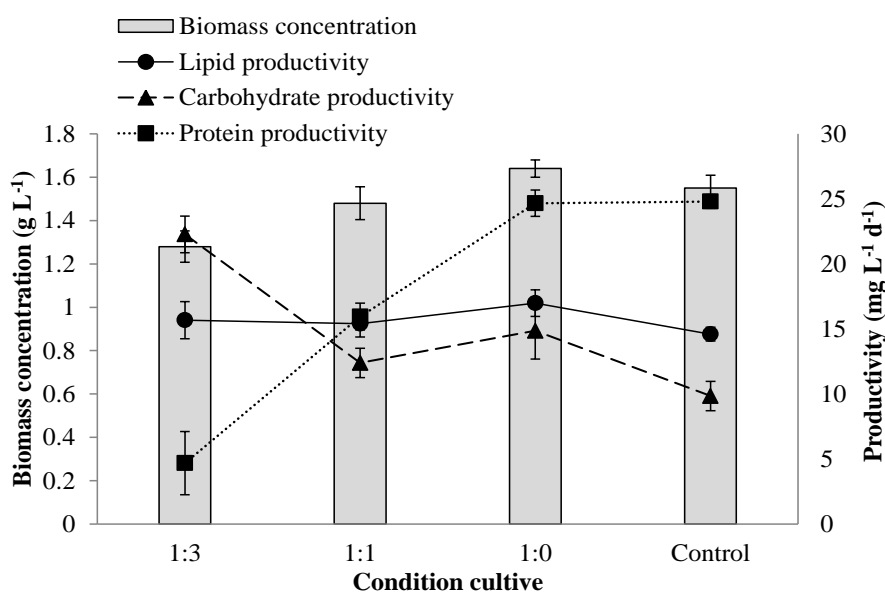


Fig. 5.4 Maximum biomass concentration and lipid, carbohydrate, protein productivity under different growing conditions 1:3 (25% tannery wastewater and 75% water), 1:1 (50% tannery wastewater and 50% water), 1:0 (100% tannery wastewater and 0% water) and control (cultivated in the TAP medium).

The dominant fatty acid compositions of lipid in the microalgae *Chlorella* sp. cultivated in tannery wastewater (1:3, 1:1, 1:0 dilution) and Tap medium (control) was determined at the end of the experiment and was listed in the Table 5.3. These results highlight that the fatty acid compositions of microalgae differ according to the culture condition, in this case, the availability of nutrients due to the different dilutions of the tannery wastewater.

In the lipid composition of microalgae grown in tannery wastewater, an increase in the content of the saturated fatty arachidic acid (C20:0) and a reduction of the saturated fatty lauric acid (C12:0) and myristic acid (C14:0) was observed by increasing dilution of the effluent. The microalgal fatty acids cultivated in this condition was mainly composed of saturated fatty acid (51.24–69.35%) and the saturated fatty acid C20:0 presented a higher percentage (9.77, 18.22%) of total lipid, for conditions 1:3, 1:1, respectively. For the 1:0 condition a higher percentage (16.62%) was observed for saturated fatty acid C14:0. Unlike the culture in tannery effluent, the biomass of the control condition showed a major composition of unsaturated fatty acids (49.41%) mainly composed of oleic acid (24.64%) and linolenic acid (24.77%). Regarding the composition of saturated fatty acids were verified higher contents of arachidic acid (12.38%). The European Standard EN 14214 sets limits on the amount of some polyunsaturated fatty acids. According to the quality standards of biodiesel there is a limit of 12% of the linolenic acid (C18:3) and 1% for polyunsaturated fatty acids (≥ 4 double bonds). As shown in Table 6.3, the linolenic acid content of fatty acids from microalgae grown in tannery wastewater was lower than 12% ranging between 5.27% (1:3) and 7.38% (1:2). However, for microalgae grown in the control condition, this value was exceeded reaching a concentration of linolenic acid of 24.77%. Among the fatty acids identified, no polyunsaturated fatty acids with four or more double bonds were observed for all cultures. Some biodiesel properties are highly dependents from feedstock. Generally, a high-quality biodiesel should have similar percentage of saturated and unsaturated fatty acids to maintain high oxidative stability and low-temperature property (Knothe, 2005; Feng et al. 2011). Saturated chains tends to crystallize at low temperatures, on the other hand unsaturated chains tend to be oxidized by air oxygen. Di and tri-unsaturated chains oxidize 40 and 80 times faster than monounsaturated ones. The composition of fatty acids had a considerable percentage of oleic acid (7.12 - 24.64%) which is considered an ideal fatty acid to exhibit a combination of oxidative stability and low-temperature property (Wu et al. 2012). Also, the biodiesel can be further improved if mix with other sources of algal oil (Chinnasamy et al. 2010).

Table 5.3. Profile of the fatty acid ethyl esters (%) obtained from the microalgae *Chlorella* sp. cultivated at 1:3, 1:1, 1:0 effluent dilutions and in the control condition (TAP medium).

Fatty acid type	FAEE (%)			
	1:3	1:1	1:0	Control
C12:0 Lauric	4.72	6.58	14.09	7.33
C14:0 Myristic	3.74	8.62	16.62	5.36
C16:0 Palmitic	4.81	3.23	6.72	-
C16:1 Palmitoleic	-	1.28	-	-
C17:0 Margaric	5.28	3.79	3.58	-
C18:0 Stearic	12.07	8.00	8.83	6.43
C18:1 Oleic	7.12	15.95	9.14	24.64
C18:3 Linolenic	5.27	7.38	5.98	24.77
C19:0 Nonadecylic	5.82	3.76	6.51	-
C20:0 Arachidic	18.22	9.77	8.54	12.38
C22:0 Behenic	13.18	7.49	4.46	3.65
C22:1 Erucic	5.87	4.03	-	-
Others	13.90	20.11	15.53	19.09
Saturated	67.84	51.24	69.35	31.50
Unsaturated	18.26	28.64	15.12	49.41
Poly-unsaturated	5.27	7.38	5.98	24.77

5.4 CONCLUSION

Tannery wastewater has been considered as an important resource for economical sustainable microalgal biomass/lipid production once nutrient supplement costs were eliminated because none additional nutrients were added to the cultivation of microalgae. The microalgae *Chlorella* sp. investigated was able to absorb nutrients, from the wastewater, for growth. High removals of TN (88.10%), NH₃-N (90.68%), PO₄-P (98.10%), IC (89.46%) and COD (71.21%) were observed. The composition of the microalgal biomass and the composition of the fatty acids were significantly related to the culture condition. High lipid contents (25.46 ± 1.61%) were verified. The combined process of treatment of effluent in conversion of microalgae biomass offer many environmental merits with production of value added products such as biodiesel.

Acknowledgements

The authors would like to thank coordination for the improvement of higher education personnel (CAPES) for the study grant and financier of studies and projects (FINEP) in the project ref. 1097/13 approved the MCTI/FINEP CT-HYDRO 01/2013.

5.5 REFERENCES

Abdelaziz AEM, Leite GB, Hallenbeck PC (2013) Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. *Environ Technol* 34:1783–1805.

Abreu AP, Fernandes B, Vicente AA, Teixeira, J, Dragone G (2012) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol* 118:61–66.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2005) Official method of analysis (18 th Ed), Washington, DC, USA

American Public Health Association - APHA (2005) Standard methods for the Examination of water and wastewater. 21th ed. Washington DC.

Beuckels A, Smolder E, Muylaert K (2015) Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water res* 77:98–106.

Bligh E, Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.

Cai T, Park SY, Li Y (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew Sust Energ Rev* 19:360-369.

Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt RW, Das KC (2010) Microalgae cultivation in wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour Technol* 101:3097–3105.

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306.

Choi WY, Kang DH, Leec SY, Lee HY (2015) High quality biodiesel from marine microalga, *Scenedesmus* sp. through *in situ* acid Transesterification. *J Chem Technol Biotechnol* 90:1245–1252.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356.

Ellis JT, Hengge NN, Sims RC, Miller CD (2012) Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresour Technol* 111:491-495.

European Standard EN 14214 (2004). Automotive fuels-fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-requirements and test methods.

Farooq W, Lee YC, Ryu BG, Kim BH, Kimhs Choi YE et al. (2013) Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. Strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresour Technol* 132:230–238.

Feng D, Chen Z, Xue S, Zhang W (2011) Increased lipid productivity of marine oleaginous micro *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour Technol* 102:6710–6716.

Gouveia L, Graça S, Sousa C, Ambrosano L, Ribeiro B, Botrel EP, Castro Neto P, Ferreira AF, Silva CM (2016) Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations. *Algal Res* 16:167–176.

- Guzatto R, Defferrari D, Reiznautt QB, Cadore IR, Samios D (2012) Transesterification double step process modification for ethyl ester biodiesel production from vegetable and waste oils. *Fuel* 92:197-203.
- Ho SH, Huang SH, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A, Chang JS (2013) Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour Technol* 135:191–198.
- Ji MK, Kim HC, Sapiroddy VR, Yun HS, Abou-Shanab RAI, Choi J, Lee W, Timmes TC, Inamuddin Jeon BH (2013) Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2701–2710.
- Jia Q, Xiang W, Yang F, Hu Q, Tang M, Chen C, Wang G, Dail S, Wu H, Wu H (2016) Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. *J Appl Phycol* 28:727–736.
- Karemore A, Pal R, Sen R (2013) Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. *Algal Res* 2:113-121.
- Knothe G (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol* 86:1059–1070, 2005.
- Lam MK, Lee KT (2012) Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol Adv* 30:673-690.
- Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S (2014) Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass Bioenergy* 66:204–213.
- Li Y, Chen YF, Chen P, Min M, Zhou W, Martinez B, Zhu J, Ruan R (2011a) Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater in nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour Technol* 102:5138–5144.
- Li Y, Zhou W, Bing H, Min M, Chen P, Ruan RR (2011b) Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresour Technol* 102:10861–10867.
- Lu W, Wanga Z, Wangd Z, Yuan Z (2015) Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. *Bioresour Technol* 192:382–388.
- Markou G (2012) Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Bioresour Technol* 116:533-535.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energy Rev* 14:217–232.
- Mostafa SSM, El-Gendy N (2017) Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* bio-diesel and its blends with Egyptian petro-diesel, *Arab J Chem* 10:2040–2050.

- Perez-Garcia O, Escalante FME, De-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products *Water Res* 45:11–36.
- Procházková G, Brányiková I, Zachleder V, Brányik T (2014) Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal Applied Phycology* 26:1359–1377.
- Samori G, Samori C, Guerrini F, Pistocchi R (2013) Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. *Water Res.*, 47:791–801.
- Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* 5:1532-1553.
- Siaut M, Cuine S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphylides C, Li-Beisson Y (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol* 11:7.
- Singh M, Das KC (2014) Low Cost Nutrients for Algae Cultivation. *Algal Biorefineries*, 69-82.
- Slade R, Bauen A (2013) Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and bioenergy* 53:29-38.
- Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Forde GM, Hoadley A (2010) Dewatering of microalgais cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J Renewable Sustain Energy* 2:012701–012715.
- Van DES, Vervaeren H, Boon N (2012) Flue gas compounds and microalgae: (Bio-) chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnol Adv* 30:1405-1424.
- Wang C, Yu X, Lv H, Yang J (2013) Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. *J Environmen Biol* 34:421-435.
- Wang L, Li Y, Chen P, Min M, Sealock A, Chen Y, Ruan RR (2010a) Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *chlorella* sp. *Bioresour Technol* 101:2623–2628.
- Wu LF, Chen PC, Huang AP, Lee CM (2012) The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresour Technol* 113:14–18.
- Zhang Y , Su H, Zhong Y , Zhang C , Shen Z , Sang W , Yan G , Zhou X (2012) The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products. *Water Res* 46:5509–5516.
- Zhu L, Wang Z, Shu Q, Takala J, Hiltunen E, Feng P, Yuan Z (2013) Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Res* 47:4294-4302.

Capítulo 6

Biodiesel production chain evaluation based on treatment of tannery wastewater using microalgae – from nutrients removal to biodiesel quality

Artigo enviado para publicação no periódico: *International Journal of Environmental Science and Technology* (JEST) em 25/09/2017.

Status: under review

Neste artigo investigou-se a cadeia da produção de biodiesel a partir do tratamento de águas residuais de curtumes, utilizando as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em efluente de curtume bruto sem diluição. Após o cultivo, foram realizados ensaios de recuperação da biomassa utilizando agentes coagulantes/floculantes inorgânicos (cloreto férrico e sulfato de alumínio) e orgânicos taninos vegetais (Tanfloc SL, Tanfloc SG e Tanfloc SH). Nestes ensaios foram verificados os efeitos da dosagem do floculante, pH, velocidade de agitação, tempo de mistura e tempo de sedimentação na recuperação de biomassa, determinando-se assim as melhores condições operacionais da coagulação-floculação seguida de sedimentação. Neste estudo também foram analisados os efeitos das condições operacionais sobre o teor de lipídios nas microalgas e na composição de ácidos graxos do biodiesel produzido a partir dos lipídios.

Biodiesel production chain evaluation based on treatment of tannery wastewater using microalgae – from nutrients removal to biodiesel quality

Juliana Tolfo da Fontoura¹, Guilherme Sebastião Rolim¹, Marcelo Farenzena² e Mariliz Gutterres¹

¹Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO), ²Laboratory of Process Control and Integration (LACIP), Chemical Engineering Post-graduated Program (PPGEQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Luiz Englert s/n°, Porto Alegre-RS, Brazil, 90040-040, (51)3308-3954, jutolfo@enq.ufrgs.br, mariliz@enq.ufrgs.br

Abstract

*This study aims at linking the treatment of raw tannery wastewater with the viability of biodiesel production from the biomass of the microalgae *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* grown in this wastewater. Biomass concentration, nutrients removal, lipid production, and composition of fatty acid were accomplished. Besides, efficiency of microalgal biomass recovery using of inorganic coagulants/flocculants (ferric chloride and aluminum sulphate) and organic (vegetable tannins) was evaluated. The maximum biomass concentration of 0.58 ± 0.04 and 0.61 ± 0.03 g.L⁻¹ and the high removals of total nitrogen (69.19 ± 1.17 and $73.27 \pm 2.31\%$), ammoniacal nitrogen (71.03 ± 2.09 and $74.85 \pm 3.81\%$), phosphorus (77.71 ± 1.95 and $78.34 \pm 1.29\%$) and COD (49.17 ± 2.09 and $52.00 \pm 2.42\%$) were observed by microalgae *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* respectively. In the recovery of biomass the Tanfloc SH vegetable tannin presented the best biomass recovery efficiency of approximately 98% for the microalgae *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* in the conditions of coagulant/flocculant dosage 450 mg of flocculant/g of biomass (Sc) and 200 mg of flocculant/g of biomass (Chl), without pH adjustment, agitation speed of 20 rpm, mixing time of 2 min and sedimentation time of 5 min. Lipid contents of 19.54 ± 1.01 and $14.24 \pm 1.40\%$ for the *Scenedesmus sp.* and 21.57 ± 1.11 - $17.46 \pm 1.82\%$ for the *Chlorella sp.* were verified for biomass in nature and flocculated respectively. The use of flocculating tannin in the recovery of microalgae did not alter fatty acid contents on FAEE.*

Keywords: Removal of nutrients, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, recovery of microalgae, flocculent vegetable tannin, lipid contents.

6.1 Introduction

Microalgae have potential as an alternative in the treatment of effluents for the reduction of organic matter, COD, BOD, elimination of nutrients such as nitrogen and phosphorus, as well as disinfection (removal of coliforms) and removal of heavy metals (Abdel-Raouf et al. 2012; Suresh et al. 2015). Microalgae have an important role in nutrient recycling, corroborated by many studies available in the literature. Authors such as Jia et al. (2016) and Gouveia et al. (2016) refer to the use of microalgae with advantages for the removal of phosphorus and nitrogen that are incorporated into the

biomass, generating a useful by-product of interest. In recent years there has been an increase in the processes and applications involving microalgae due mainly to the various substances synthesized by these microorganisms which have high value in the world market, such as fatty acids, carotenoids, vitamins, polysaccharides, sterols and various bioactive compounds (Shalaby, 2011). Due to its lipid content, microalgae emerge as a promising source for biodiesel. Currently, there is a high and growing world demand for energy, and the use of fossil fuels has serious impacts on the environment and human life, as well as emitting greenhouse gases into the biosphere, thus contributing to global warming (Agustini et al. 2017). The inclusion of biofuels into energy fuel mix stands out as an alternative to petroleum, and also to the reduction of pollutants. Because they have high lipid reserves, up to 50% of the weight of dry biomass, microalgae have been considered as an alternative source to diversify the raw materials used for renewable energy production (Baumgartner et al. 2013, Chen et al. 2011).

The advantages of microalgae for this purpose include high production rates and high oil yields per hectare compared to traditional agricultural crops, the potential to grow microalgae on non-arable land, low seasonal limitation, and the use of freshwater urban, agricultural and industrial residues as a source of nutrients for its growth (Chisti, 2007).

However, despite the above mentioned advantages, the practice of this technology is not yet economically feasible, among other reasons, due to the high cost of with the cultivation (nutrients and fresh water contribute up to 50% of the total biomass production cost) and the costs of biomass recovery (Sing and Das, 2014; Uduman et al. 2010).

The dilute nature of microalgal cultures makes the harvesting of the algal biomass may represent 20 to 30% of total production costs (Uduman et al. 2010). Currently, coagulation/flocculation is considered the most economical and convenient process, since it allows the rapid treatment of high volumes of microalgae cultures (Vandamme et al. 2013). A class of chemicals widely used for the flocculation of microalgae are organic flocculants that allows efficient recovery of microalgae in smaller dosages and a reduced impact on the environment compared to the metallic salts (Banerjee et al. 2012). Cationic organic polymers, of essentially vegetal origin, extracted from black acacia (*Acacia mearnsii*) bark act as flocculating agents. The use of vegetable tannins is widely developed in the leather industry as a tanning agent (Gutterres, 2007), as well as

the removal of chemical contaminants (Beltrán-Heredia et al. 2009) and turbidity in wastewater treatment (Gutterres and Matos, 2006; Sánchez-Martín et al. 2010). In recent years the potential application of tannins in the recovery of microalgae (Roselet et al. 2016) was accomplished.

In view of these questions, this work had the objective Study the chain of biodiesel production from treatment of tannery wastewater, using the microalgae. The growth of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. and the removal of nutrients from raw tannery wastewater were verified. In the recovery of the microalgal biomass, the performance of organic flocculating agents of vegetal tannins against the inorganic flocculants ferric chloride and aluminum sulfate were evaluated. The effects of coagulant/flocculant dosing, pH, mixing time, stirrer velocity and sedimentation time were verified. Finally, the effects of operational conditions on lipid content in microalgae and fatty acid composition were investigated.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Microalgae and tannery wastewater

The culture of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. was maintained in Guillard Modified and TAP medium, respectively, in 250 mL Erlenmeyer flasks and adapted at 25 °C, under constant aeration and continuous lighting of 80 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ with photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark. The growth until the exponential phase culture served as the inoculum. The effluent was collected directly from the beamhouse process from a tannery located in the south of Brazil. The characterization of the effluent consists of 4841 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ chlorides (Cl^-), 124.45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ total nitrogen (TN), 81.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ammoniacal nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$), 1.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphorus ($\text{PO}_4\text{-P}$), and 2142 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ chemical oxygen demand (COD). The pH of the wastewater was 7.64.

The microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. were cultivated in the tannery wastewater without pre-treatment and without addition of nutrients. Cultures were carried out in 5 liters plastic bottles, with photoperiod of 12/12 h (light intensity 80 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), for 12 days at room temperature (25 °C). The aeration was performed with 1 L min^{-1} of air. The inoculum volume (from the exponential phase) was standardized for all assays at a 10.0% (v/v) ratio, to a final volume of 4 L. Biomass concentration was monitored daily by optical density (OD) measured at wavelength of

570 nm using a spectrophotometer (model T80 + UV/Vis, PG Instruments) after appropriate dilution. The optical density was related to the dry weight of the microalgae biomass measured by gravimetry in previously weighed fiberglass filters ($R^2 = 0.997$ and $R^2 = 0.990$ for *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp., respectively).

6.2.2 Microalgal biomass recovery experiments

In order to quantify recovery efficiency of microalgae, the tests were carried out on Jar Test equipment (PoliControl, model FlocControl III), where 6 Beckers of 600 mL are used, which were filled in with 200 mL of microalgae suspension.

In a first test, the efficiencies of the coagulation/flocculation of the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. using the coagulants/flocculants ferric chloride, aluminum sulfate, and commercial flocculants of vegetable tannins A, B, C, respectively Tanfloc SL, Tanfloc SG and Tanfloc SH, yielded by the company TANAC S.A. in the proportion of 250 mg of flocculant/g of microalgae was verified. The coagulants/flocculants were supplied powder and stock solutions of 25 g.L^{-1} were prepared by the addition of distilled water. During the addition of the flocculating agents, in a first stage (step of rapid mixing and destabilization of the particles) microalgae suspensions were intensively mixed (150 rpm) for 2 min thereby permitting a dispersion of the coagulant/flocculant. In the second stage (flocculation step), the microalgae suspensions were subjected to a smoother mixing (20 rpm) for 5 min to formation the flakes. After flocculation, the samples were allowed to stand for 15 min. Thereafter, 3 mL of each sample was collected at 2/3 of the solution height. For the flocculant that presented better performance under these conditions, dosage tests were carried out where the ratio between 150 and 450 mg of flocculant/g of microalga was varied.

In order to determine the best pH value for the action of the flocculant, the microalgae suspensions were adjusted to values between 5 and 9 using hydrochloric acid (1 M) or sodium hydroxide (1 M). In addition, the effects of the variables mixing time (from 2 min to 60 min), stirring speed (from 10 rpm to 150 rpm), and sedimentation time (1 min at 60 min) were verified. All tests were performed in duplicate. The absorbance at 570 nm of the microalgae suspension was measured before addition of the flocculant (OD_i) and after sedimentation (OD_f). The recovery efficiency (Re (%)) was calculated according to Equation 1 (Granados et al. 2012):

$$Re(\%) = \frac{OD_i - OD_f}{OD_i} * 100 \quad (1)$$

Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, with a significance level of 95% ($\alpha = 0.05$), using SISVAR software.

6.2.3 Determination of total lipids

Total lipids were extracted with the chloroform: methanol (1:1, v/v) solvents and quantified in triplicate by gravimetric method according to methodology described by Bligh and Dyer (1959).

Fatty acid ethyl esters (FAEE) were obtained by transesterification of lipids following the methodology proposed by Guzzato et al. (2012). The fatty acid mixture composition was determined in a Shimadzu 2010 gas chromatography equipped with a flame ionization detector, AOC 20i auto-sampler and OV CARBOWAX 20 M (30 m x 320 μm x 0,25 μm).

6.3 Results and Discussion

6.3.1 Microalgae growth and tannery wastewater treatment

The growth curves of *Scenedesmus* sp. (Sc) and *Chlorella* sp. (Chl) grown in raw tannery wastewater are shown in Figure 6.1. Biomass concentrations were determined on daily basis and the maximum biomass concentration was observed at the end of the experiment being $0.58 \pm 0.04 \text{ g.L}^{-1}$ for Sc and $0.61 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$ for Chl.

In the cultures, a latency phase (lag phase of the growth curve) of the microalgae was not observed. Both *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. demonstrated good adaptation capacity for tannery wastewater.

At this predetermined 12-day culture time, the stationary phase was also not observed, indicating that if the grown were for a longer time the biomass production would be higher.

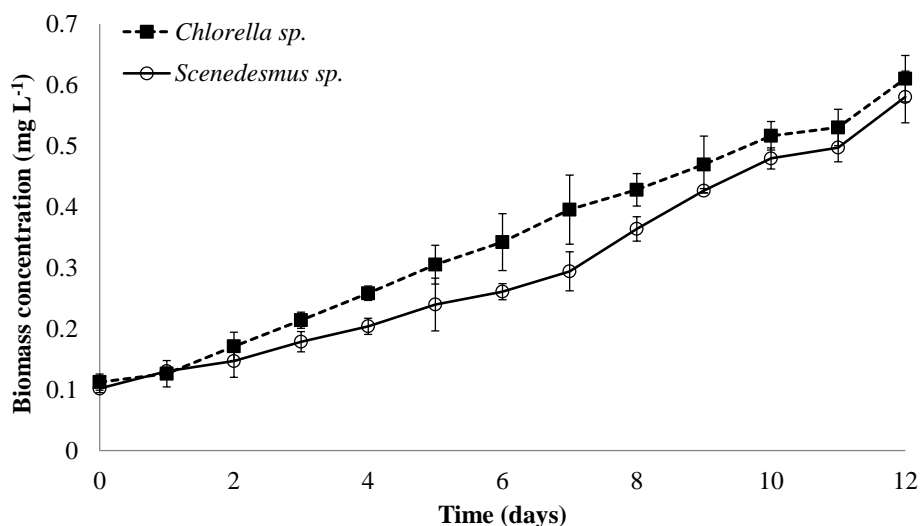


Figure 6.1: Growth curves of microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* in tannery wastewater without previous treatment.

The removal of total nitrogen (TN), ammoniacal nitrogen (NH₃-N), phosphorus (PO₄-P), and chemical oxygen demand (COD) from tannery wastewater by microalgae cultivation are shown in Figure 6.2. After 12 days of microalgal cultivation, the total nitrogen content was highly reduced by $69.19 \pm 1.17\%$ (Sc) and $73.27 \pm 2.31\%$ (Chl) but not completely removed, indicating there were still some organic compounds that could not be converted inorganic nitrogen and assimilated by microalgae. Significant reductions the ammoniacal nitrogen of $71.03 \pm 2.09\%$ and $74.85 \pm 3.81\%$ and the phosphorus of $77.71 \pm 1.95\%$ and $78.34 \pm 1.29\%$ were observed by the *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*, respectively. COD in the raw tannery wastewater were utilized by microalgae as one of carbon sources to some extent ($49.17 \pm 2.09\%$ - Sc and $52.00 \pm 2.42\%$ - Chl). High removals of ammoniacal nitrogen (85.63%), phosphorus (96.78) and COD (80.33%) were observed by Fontoura et al. (2017), when they cultivated the microalga *Scenedesmus sp.* raw tannery wastewater. In this study, maximum biomass concentrations of 0.90 g.L^{-1} were also verified.

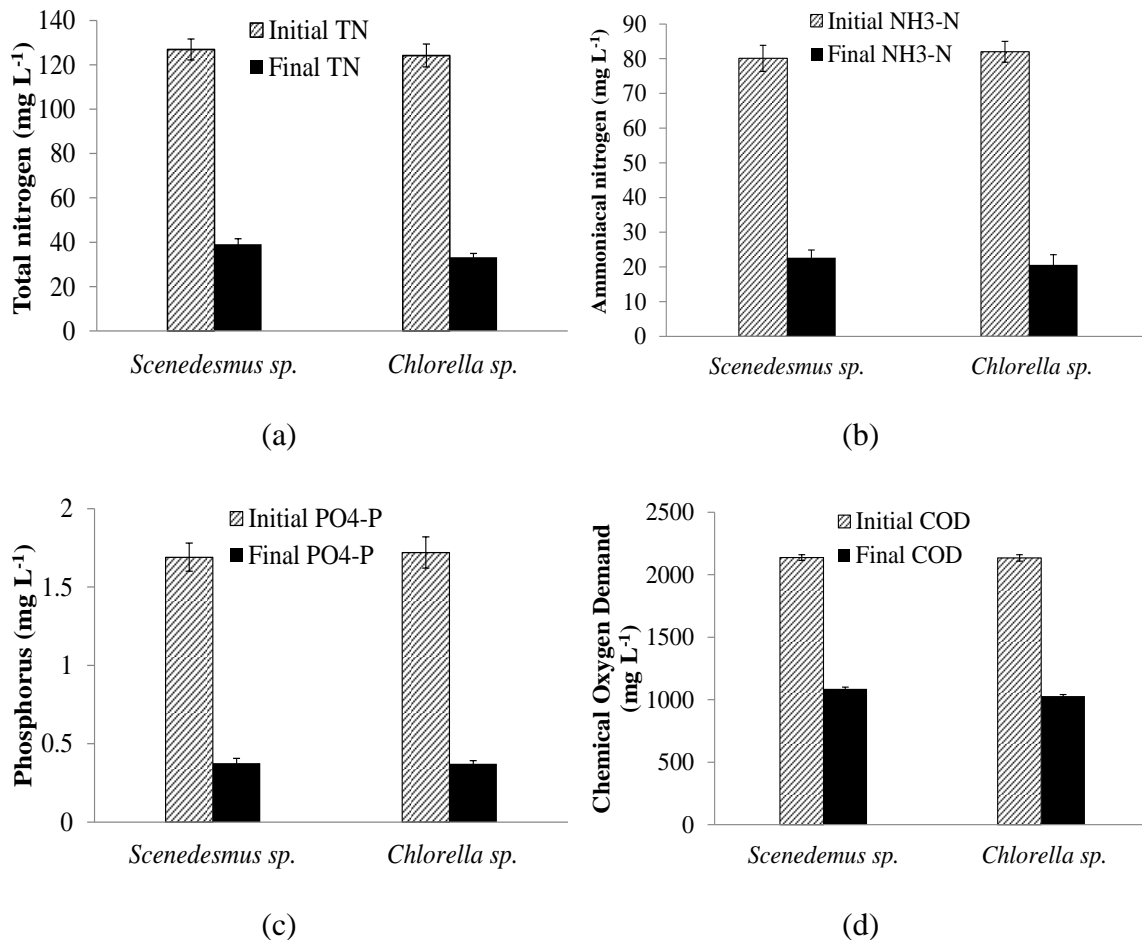


Figure 6.2: Initial and final (after treatment) concentrations of (a) total nitrogen (TN), (b) ammoniacal nitrogen (NH₃-N), (c) phosphorus (PO₄-P) and (d) chemical oxygen demand (COD).

6.3.2 Assays for recovery of microalgae biomass

Table 6.1 shows the recovery percentage of the microalgae *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* in the proportion of 250 mg of flocculant/g of biomass using the different coagulants/flocculants. Inorganic coagulants/flocculants (ferric chloride and aluminum sulphate) presented low recovery efficiencies of microalgae, obtaining maximum recovery of $74.53 \pm 1.32\%$ for *Scenedesmus sp.* and $86.19 \pm 0.31\%$ *Chlorella sp.* using ferric chloride. Among organic coagulants/flocculants based on vegetable tannins high recovery of the microalgae *Scenedesmus sp.* ($85.66 \pm 1.02\%$) and *Chlorella sp.* ($98.82 \pm 0.19\%$) was obtained using the flocculating tannin C (Tanfloc SH). There was positive influence in the use of vegetable tannins for the sedimentation of microalgae throughout the neutralization of the impingent charges. Thus, for the continuity of this work, the flocculant tannin C was chosen due to its better efficiency in the recovery of both microalgae.

Table 6.1: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. using different flocculants in the proportion of 250 mg/g microalgae.

Coagulants/flocculants	Recovery of sedimented biomass (%)	
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.
Ferric chloride	74.53 ± 1.32	86.19 ± 0.31
Aluminum sulfate	66.48 ± 0.24	84.85 ± 1.05
Vegetable tannin A	83.62 ± 0.85	97.73 ± 0.43
Vegetable tannin B	83.72 ± 0.51	97.76 ± 0.17
Vegetable tannin C	85.66 ± 1.02 ^a	98.82 ± 0.19 ^a

^aSignificant factors (p <0.05).

Table 6.2 shows the effect of the dosages of flocculent vegetable tannin C on biomass recovery of the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp., where the pH, mixing time, stirring speed, and sedimentation time variables similar to the previous assay were maintained.

Firstly, the dosage of the flocculant was varied from 150 to 275 mg of flocculant/g of biomass (assay 1 to 6) for both microalgae. In these assays highest recovery was observed for the dosage of 275 mg of flocculant/g of biomass, being 87.49 ± 1.37% for microalgae *Scenedesmus* sp. and 98.82 ± 0.37% for microalgae *Chlorella* sp.

The recoveries obtained for the microalgae *Chlorella* sp. did not present significant variation (p > 0.05) in the proportions of 200, 225, 250 and 275 mg of flocculant/g of biomass. So that, it was decided to carry out the next tests fixing the proportion of flocculent vegetable tannin C in 200 mg flocculant/g of biomass for this microalga. For the microalgae *Scenedesmus* sp. low recovery rates were found in the proportions between 150-275 mg of flocculant/g of biomass (assay 1 to 6), so new coagulation/flocculation assays were carried out by raising the dosages of the flocculating agent varying between 300-550 mg of flocculant/g of biomass (assay 7 to 12). There was no significant variation (p > 0.05) between the dosages 450, 500 and 550 mg of flocculant/g of biomass, thus it was fixed the dosage of the flocculating agent in 450 mg of flocculant/g of biomass for the next assays.

The probable mechanisms involved in this coagulation/flocculation are adsorption and charge neutralization (Sánchez-Martín et al. 2009; Beltrán-Heredia et al. 2010).

The high coagulant/flocculant dosages required for flocculation of *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. microalgae can be explained due to the presence of high

concentrations of salts in the tannery wastewater, which causes a high ionic strength, damaging the formation of the agglomerates.

König et al. (2014) used a cationic polyelectrolyte in the recovery of the marine microalga *Conticribra weissflogii* and reported that salinity negatively impacted the flocculation process. An inefficient performance in water with high levels of chlorides was reported by Vandamme et al. (2010) in the recovery of the microalgae *Phaeodactylum*, *Nannochloropsis* using cationic starch.

Table 6.2: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. using different dosages of the flocculating tannin C

Assay	Dosing of flocculating vegetable tannin C (mg of flocculant/g of biomass)	Recovery of sedimented biomass (%)	
		<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.
1	150	81.46 ± 1.37	90.49 ± 0.22
2	175	81.82 ± 1.60	94.39 ± 0.62
3	200	84.54 ± 1.22	98.28 ± 0.22 ^a
4	225	84.77 ± 1.09	98.68 ± 0.23 ^a
5	250	86.26 ± 1.10	98.78 ± 0.41 ^a
6	275	87.49 ± 1.37	98.82 ± 0.37 ^a
7	300	89.40 ± 0.68	-
8	350	93.16 ± 0.23	-
9	400	94.26 ± 0.23	-
10	450	97.08 ± 0.18 ^a	-
11	500	97.21 ± 0.09 ^a	-
12	550	97.37 ± 0.23 ^a	-

^aSignificant factors (p < 0.05).

Table 6.3 shows the recovery percentage of the microalgae biomass *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. at the doses of 450 and 200 mg of flocculant/g of biomass, respectively with the variation of pH and stirring speed.

In the pH range from 5.0 to 8.0 the recovery remained around 97% for *Scenedesmus* sp. and 99% for *Chlorella* sp., with no significant difference between the tests (p > 0.05). Previous studies have also shown that pH does not interfere in the coagulation/flocculation with tannins (Beltrán-Heredia et al. 2009). From the statistical analysis it was verified that pH does not affect the recovery, so for the next tests it was not necessary to adjust the pH, remaining at 7.9 and 8.12 (final pH values of the cultures of *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp., respectively).

In the evaluation of the speed of agitation in the flocculation step (second stage), stirring of the rapid mixture (first stage) was maintained at 150 rpm for 2 minutes for all the tests, then the agitation was changed to 10, 20, 50, 100, 120 and 150 rpm for 5 minutes. According to Table 6, it is observed that higher agitation rates for flocculation

(120 and 150 rpm) decrease the efficiency of microalgae recovery, reaching $69.76 \pm 0.42\%$ for *Scenedesmus* sp. and $90.19 \pm 0.82\%$ for *Chlorella* sp. Beltrán-Heredia et al. (2009) report that the speed of the agitator is an important parameter in the formation of agglomerates. Because it is related to the collision between the particles, high speeds can destabilize the flakes already formed or in formation. Thus, for the next tests it was chosen to use a stirring speed of 20 rpm in order to avoid damages to the algal agglomerates.

Table 6.3: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. under dosages of 450 and 200 mg flocculant/g biomass of the flocculating tannin C respectively, varying the pH and Stirring speed in the flocculation step

Assay	pH	Recovery of sedimented biomass (%)		Assay	Stirring speed in the flocculation step (rpm)	Recovery of sedimented biomass (%)	
		<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.			<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.
1	5.0	97.72 ± 0.47^a	99.10 ± 0.24^a	1	10	96.98 ± 0.32	96.71 ± 0.39
2	6.0	97.63 ± 0.26^a	99.23 ± 0.12^a	2	20	97.89 ± 0.58^a	98.34 ± 0.27^a
3	6.5	97.50 ± 0.26^a	99.17 ± 0.14^a	3	50	97.67 ± 0.31^a	97.43 ± 0.34^a
4	7.0	97.41 ± 0.30^a	99.01 ± 0.13^a	4	100	95.49 ± 0.65	95.27 ± 1.35
5	7.5	97.26 ± 0.17^a	98.78 ± 0.27^a	5	120	85.18 ± 0.17	92.15 ± 0.78
6	8.0	96.87 ± 0.34^a	98.47 ± 0.30^a	6	150	69.76 ± 0.42	90.19 ± 0.82

^a Significant factors ($p < 0.05$).

Table 6.4 shows the effect on the recovery of the microalgae biomass in relation to the mixing time of the flocculation step and the sedimentation time.

In assays of mixing time, the rapid mixing step (first stage) the stirring was maintained at 150 rpm for 2 minutes. In the flocculation step (second stage) the stirring speed was set at 20 rpm and the flocculation times tested were 2, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes. It is observed that as the flocculation time increases, there is a small reduction in the recovery of microalgae. The smaller recovery efficiencies were $94.77 \pm 0.16\%$ and $97.62 \pm 0.70\%$ for the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp., respectively at 120 min of flocculation time. There was no significant difference comparing the tests carried out at the flocculation times of 2 and 5 min for the microalgae *Scenedesmus* sp. and 2, 5, 10 min for the microalgae *Chlorella* sp., which recovered approximately 98%. Thus, for the sedimentation test the lowest flocculation time (2 min) was used.

In the sedimentation test, the flocculant dosage, pH, stirring speed in the flocculation, and Flocculation times were kept constant (450 mg of flocculant/g biomass, 7.9, 20 rpm and 2 min for *Scenedesmus* sp. and 200 mg of flocculant/g biomass, 8.12, 20 rpm and 2 min for *Chlorella* sp.). Table 6.4 shows the effect of

sedimentation time on microalgae recovery using these optimal conditions. It is observed that sedimentation times above 5 min did not affect biomass recovery ($p > 0.05$) under the conditions tested. Recoveries close to 98% were verified for both microalgae. Rapid recovery was obtained due to the formation of large agglomerates, thus facilitating the action of gravity.

Table 6.4: Recovery of sedimented biomass (%) of microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. under dosages of 450 and 200 mg flocculant/g biomass of the flocculating tannin C respectively, varying the flocculation time and the sedimentation time.

Assay	Flocculation time (min)	Recovery of sedimented biomass (%)		Assay	Sedimentation time (min)	Recovery of sedimented biomass (%)	
		<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.			<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.
1	2	97.73 ± 0.13 ^a	98.28 ± 0.58 ^a	1	1	96.43 ± 0.63	97.95 ± 0.10
2	5	97.86 ± 0.14 ^a	98.34 ± 0.31 ^a	2	5	97.98 ± 0.08 ^a	98.45 ± 0.28 ^a
3	10	95.50 ± 0.22	98.15 ± 0.12 ^a	3	10	98.06 ± 0.11 ^a	98.17 ± 0.32 ^a
4	20	94.91 ± 0.13	97.13 ± 0.22	4	15	98.20 ± 0.22 ^a	98.37 ± 0.13 ^a
5	30	94.84 ± 0.14	96.98 ± 0.42	5	30	98.23 ± 0.36 ^a	98.32 ± 0.17 ^a
6	60	94.77 ± 0.16	96.62 ± 0.30	6	60	97.73 ± 0.47 ^a	98.12 ± 0.20 ^a

^a Significant factors ($p < 0.05$).

6.3.3 Analysis of lipid content

Table 6.5 shows the lipid content accumulated by *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. in nature and flocculated with flocculating tannin C and the predominant composition of the content of the fatty acids produced from the transesterification of crude lipid of microalgae.

In the determination of the total lipids present in the biomass of the microalgae in natura and flocculated (Table 6.5), contents of $19.54 \pm 1.01\%$ - $14.24 \pm 1.40\%$ and $21.57 \pm 1.11\%$ - $17.46 \pm 1.82\%$ were verified for microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. respectively. An average reduction of 27.08% was observed for Sc microalgae and 19.73% for Chl microalgae when compared the lipid content of the microalgal biomass in natura with flocculated. These reductions can be explained by the contribution of the flocculant incorporated in the dry biomass.

It was observed the recovery process of the microalgae using the coagulant/flocculant based on tannin C did not interfere in the dominant composition of fatty acids (FAEE) of the microalgae species. The microalgal lipid from *Scenedesmus* sp. was mainly composed of saturated fatty acid (63.13 – 65.5%) and the saturated fatty acids behenic acid (22:0) presented a significant percentage (30.71 – 36.90%) of total lipid. The unsaturated fatty acids of the microalga *Scenedesmus* sp. are basically composed of oleic acid (18:1). The microalgae *Chlorella* sp. also showed higher levels

of saturated fatty acids (59.97 – 60.24%) with predominance of nonadecylic fatty acids (14.79 – 15.61%) and Arachidic acid (14.31 – 14.21%). Among the unsaturated fatty acids stand out the oleic acid (18:1) and erucic acid (22:1).

According to the quality standards of biodiesel from European Standards (EN, 2004), the linolenic acid (C18:3) content has a limit of 12% for a quality biodiesel. As shown in Table 6.5, in all biomass conditions of the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. cultivated in raw tannery effluent, no linolenic acid content was identified.

Moreover, the FAEEs reported higher proportions of SFAs over USFAs which is indicative of the quality and usage of microalgal oil as biodiesel, since higher concentrations of USFAs may increase the risk of polymerization and thus lower the stability of the fuel (Devi et al. 2012).

Table 6.5: Dominant fatty acids composition of lipid accumulated by *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. in nature and flocculated with flocculating tannin C

	Sc in natura	Sc flocculated	Chl in natura	Chl flocculated
Lipid content (%)	19.54 ± 1.01	14.24 ± 1.40	21.57 ± 1.11	17.46 ± 1.82
Fatty acid (% of total fatty acid)				
Lauric(12:0)	17.99	14.82	2.19	2.79
Myristic (14:0)	14.43	13.78	2.00	1.42
Palmitic (16:0)	-	-	4.41	4.59
Stearic (18:0)	-	-	9.57	9.29
Oleic (18:1)	24.64	24.83	10.29	14.02
Nonadecylic (19:0)	-	-	14.79	15.61
Arachidic acid (20:0)	-	-	14.31	14.21
Behenic (22:0)	30.71	36.90	12.70	12.33
Erucic (22:1)	-	-	19.24	16.32
Others	12.23	9.67	10.50	9.41
SFAs	63.13	65.5	59.97	60.24
USFAs	24.64	24.83	29.53	30.34

SFAs - saturated fatty acids

USFAs - unsaturated fatty acids

6.4 Conclusion

This study showed that the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. were able to use the nutrients present in the tannery wastewater, resulting in the increase of microalgal and in the removal of TN (69.19 ± 1.17 and $73.27 \pm 2.31\%$), $\text{NH}_3\text{-N}$ (71.03 ± 2.09 and $74.85 \pm 3.81\%$), $\text{PO}_4\text{-P}$ (77.71 ± 1.95 and $78.34 \pm 1.29\%$) and COD (49.17 ± 2.09 and $52.00 \pm 2.42\%$). In the recovery phase of biomass the flocculent tannin C presented satisfactory recovery of the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.

cultivated in tannery wastewater. The variable pH did not depicted present a significant effect on the recovery of microalgae. High recoveries of biomasses of approximately 98% were reached for the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. under In the flocculant dosage conditions 450 mg flocculant/g biomass (Sc) and 200 mg flocculant/g biomass (Chl), agitation speed of 20 rpm, flocculation time of 2 min and sedimentation time of 5 min. With the flocculation the lipid content of the microalgae *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. was reduced by an average of 27.08% and 19.73%, however, no alterations were observed in the fatty acid contents.

6.5 References

- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM (2012) Microalgae and wastewater treatment. Saudi J Biol Sci 19:257–275.
- Agustini CB, Neto WLD, Priebe GPS, Costa M, Gutterres M (2017) Biodegradation of Leather Solid Waste and Manipulation of Methanogens and Chromium-resistant Microorganisms. J Am Leather Chem As 112(1):7–14.
- Banerjee C, Gupta P, Mishra S, Sen G, Shukla P, Bandopadhyay R (2012) Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. Inte J Biol Macro 51(4):456-461.
- Baumgartner TRS, Burak JAM, Kogikoski ME, Sebastien YN, Arroyo PA (2013) Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. Braz J Biosci 11(2):250-255.
- Beltrán-Heredia J, Sánchez-Martín J, Solera-Hernández C (2009) Removal of sodium dodecyl benzene sulfonate from water by means of a new tannin-based coagulant: optimization studies through design of experiments. Chem Eng J 153:56–61.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem and Phys 37:911-917.
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresour Technol, 102:71–81.
- Chisti Y, (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv, 25:294–306.
- Devi MP, Subhash GV, Mohan SV (2012) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. Renew Energ 43:276-283.
- Fontoura JT, Rolim GS, Farenzena M, Gutterres M (2017) Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. Process Saf Environ 111:355–362.
- Gouveia L, Graça S, Sousa C, Ambrosano L, Ribeiro B, Botrel EP, Castro Neto P, Ferreira AF, Silva CM (2016) Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations. Algal Res 16:167–176.

- Granados MR, Acién FG, Gómez C, Fernández-Sevilla JM, Molina Grima E (2012) Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresour Technol* 118:102–110.
- Gutterres M (2007) Analysis of vegetable tannin absorption during the tanning of hide/hide powder. *J Am Leather Chem As* 102(7):216–221.
- Gutterres M, Matos EA (2006) Emprego de Tanino Vegetal no Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuárias. *Saneamento Ambiental* 119:29-33.
- Guzatto R, Defferrari D, Reiznautt QB, Cadore IR, Samios D (2012) Transesterification double step process modification for ethyl ester biodiesel production from vegetable and waste oils. *Fuel* 92:197-203.
- Jia Q, Xiang W, Yang F, Hu Q, Tang M, Chen C, Wang G, Dail S, Wu H, Wu H (2016) Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. *J Appl Phycol* 28:727–736.
- König RB, Sales R, Roselet F, Abreu PC (2014) Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants, *Biomass Bioenerg* 68:1–6.
- Roselet F, Burkert J, Abreu PC (2016) Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. *Biomass Bioenerg* 87:55 – 60.
- Sánchez-Martín J, Beltrán-Heredia J, Solera-Hernández C (2010) Surface water and wastewater treatment using a new tannin-based coagulant. Pilot plant trials. *J Environ Manag* 91:2051–2058.
- Shalaby EA (2011) Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signal Behav* 6(9):1338-50.
- Singh M, Das KC (2014) Low Cost Nutrients for Algae Cultivation. *Algal Biorefineries*, p.69-82.
- Suresh Kumar K, Dahms HU, Won EJ, Lee JS, Shin KH (2015) Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:329–352.
- Uduman N, Qi Y, Danquaha MK, Forde GM, Hoadley A (2010) Dewatering of microalgais cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J Renew and Sustain Ener* 2(1):012701 1-15
- Vandamme D, Foubert I, Meesschaert B, Muylaert K (2010) Flocculation of microalgae using cationic starch. *J Appl Phycol* 22:525–530.
- Vandamme D, Foubert I, Muylaert K (2013) Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol* 31:233–239.

Capítulo 7

Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye from tannery effluent

Artigo publicado no periódico: *Journal of Environmental Chemical Engineering* (JECE) em 23/09/2017.

Neste artigo investigou-se o uso de biomassa de microalgas desengordurada - DMB (resíduos de biocombustível microalgal) - como proposta alternativa de adsorvente de corantes da indústria coureira. A biomassa foi caracterizada por técnicas analíticas de Potencial Zeta, FTIR, MEV, BET e BJH. Os ensaios de adsorção foram realizados utilizando uma solução aquosa do corante Acid Blue 161 (AB-161) e os estudos de equilíbrio foram realizados por variação em diferentes parâmetros, tais como, pH (2-11), dosagem biossorvente (0,005-0,040 g), tempo de contato (0 - 540 min), temperatura (25 - 40 °C) e concentração de corante (200-1500 mg.L⁻¹).

Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye from tannery effluent

Juliana Tolfo da Fontoura^{1*}, Guilherme Sebastião Rolim¹, Bianca Mella¹, Marcelo Farenzena², and Mariliz Gutterres¹

¹ *Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO)*, ² *Laboratory of Process Control and Integration (LACIP), Chemical Engineering Post-graduated Program (PPGEQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Luiz Englert s/n°, Porto Alegre-RS, Brazil, 90040-040, (51)3308-3954, jutolfo@enq.ufrgs.br, mariliz@enq.ufrgs.br*

ABSTRACT

The present study investigates the use of defatted microalgal biomass - DAB (waste from microalgal biofuel) as an alternative proposal adsorbent of leather dyes. The biomass was characterized by analytical techniques of Zeta Potential, FTIR, SEM, BET and BJH. The sorption experiments were performed using aqueous dye solutions of Acid Blue 161 (AB-161) and the equilibrium studies were carried out by variation in different parameters, i.e., pH (2–11), biosorbent dosage (0.005–0.040 g), contact time (0 – 540 min), temperature (25 - 40 °C) and dye concentration (200-1500 mg.L⁻¹). In the evaluation of the kinetic mechanism that controls the adsorption process examined at 200 and 400 mg.L⁻¹, it was observed that data fitted quite well with general order kinetic model. Freundlich isotherm model showed the best fit of the equilibrium data at both experimental temperatures. The maximum amounts of AB-161 dye adsorbed were 75.78 mg.g⁻¹ at 25 °C and 83.2 mg.g⁻¹ at 40 °C. For treatment of real tannery wastewater, the results show that DMB significantly reduced the dye concentration (76.65%), TOC (50.78%) and TN (19.80%). From the thermodynamic parameters for the adsorption of AB-161 with DMB indicated a spontaneous endothermic process with a physical reaction by electrostatic interaction. Therefore, defatted microalgal biomass showed to be a promising material for adsorption of dye from tannery effluent.

Keywords: biosorption, defatted microalgae, *Scenedesmus* sp., azo dye, Acid Blue 161, tannery wastewater.

Nomenclature

AB-161	Acid Blue 161 dye
DMB	Defatted microalgal biomass
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
SEM	Scanning electron microscopy
BET	Brunauer–Emmett–Teller surface area
BJH	Barrett–Joyner–Halenda pore size
q	Amount of dye adsorbed by the adsorbent (mg.g^{-1})
C_o	Initial dye concentration put in contact with the adsorbent (mg.L^{-1})
C_f	Dye concentration after the batch adsorption procedure (mg.L^{-1})
V	Volume of dye solution put in contact with the adsorbent (L)
m	Mass of adsorbent (g)
R^2	Determination coefficient
R_{adj}^2	Adjusted determination coefficient
SD	Standard deviation
$q_{i,model}$	Value of q predicted by the fitted model
$q_{i,exp}$	Value of q measured experimentally
$\bar{q}_{i,exp}$	Average of q experimentally measured
p	Number of parameter of the fitted model
TOC	Total organic carbon
TN	Total nitrogen
k_f	Pseudo-first-order rate constant (min^{-1})
q_e	Amount of adsorbate adsorbed at the equilibrium (mg.g^{-1})
q_t	Amount of adsorbate adsorbed at time t (mg.g^{-1})
n	Adsorption reaction order with regard to the effective concentration of the adsorption sites available on the surface of adsorbent
k_s	pseudo-first-order rate constant ($\text{g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
k_N	General-order rate constant ($\text{h}^{-1}.\text{(g.mg}^{-1}\text{)}^n$)
K_L	Langmuir equilibrium constant (L.mg^{-1})
Q_{max}	Maximum adsorption capacity of the adsorbent, Langmuir Isotherm (mg.g^{-1})
C_e	Dye concentration at the equilibrium (mg.L^{-1})
K_F	Freundlich equilibrium constant ($\text{mg.g}^{-1}.\text{(mg.L}^{-1}\text{)}^{-1/n_F}$)
n_F	Dimensionless exponent of the Freundlich equation
pH_{pzc}	Point of zero charge
ΔH^0	Standard enthalpy change (kJ.mol^{-1})
ΔG^0	Standard gibbs free energy change (kJ.mol^{-1})
ΔS^0	Standard entropy change ($\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

7.1 INTRODUCTION

Algae are promising sources of biofuel due to their lipid content, as well as ability to utilize wastewater for cultivation, besides non requirement of fertile land, do not compete with food crops and reduce greenhouse gas from the environment [1,2]. However, after lipid extraction about 70% of the microalgae biomass remains intact [3]. It is estimated that approximately 2.4 kg of waste is generated for each liter of biodiesel produced from microalgae [4].

Recent research has been focusing on practicality and sustainability of algal biofuels. The use of the residual biomass is a way to maximize the production of energy obtained through the microalgae and reduce the total costs of the processes and waste treatment. Numerous studies include the use of residual biomass as a substrate for bioethanol, biogas in addition to be used as animal/poultry/fish feed and fertilizer [5]. A suitable economical use of defatted microalgal biomass (DMB) is its application as an adsorbent for the removal of dyes from industrial wastewater.

Dye pollution has grown rapidly due to increased use of synthetic dyes [6,7]. The leather industry is one of the great contributors to this, as uses dyes and other chemicals to give leather the sensory characteristics of surface and deep coloring and uniformity [8].

The discard of wastewater containing dye into water bodies, affect adversely the aquatic environment by impeding light penetration and, as a consequence, inhibiting photosynthetic activity [9,10]. Moreover, most of these dyes can cause serious problems to human health.

The most commonly used methods for dye removal from industrial effluents are coagulation and flocculation [11], biological oxidation and chemical precipitation [12] and activated carbon adsorption [13,14]. The adsorption treatment method has shown promise for the removal of dyes and organic compounds from aqueous effluents [15,16,17,18,19] due its simplicity and high efficiency, as well as the availability of a wide range of adsorbents that can be applied [20,21,22].

Activated carbon is the most commonly used adsorbent for the removal of dyes because of its high surface area and adsorption capacity. However, there is a growing interest in using low cost, commercially available materials as these are derived from non-renewable sources [23] and are relatively expensive.

Different kinds of alternative adsorbents to remove dyes and other contaminants from the leather industry from aqueous solutions have been reported, such as leather

waste samples from the shaving operation of chromium tanned leather [16,19], papaya seed [24], fungal biomass [25], algae [26], cattle hair waste [27], ficus auriculata leaves [28], Sterculia guttata shell [29] and others.

The biomass of microalgae contains a variety of functional groups present in the surface such as hydroxyl, carboxyl, phosphate, sulphate, and other charged groups which can be mediate pollutant binding [21,30]. Biomass algal has been successfully employed to remove heavy metals [31,32], food dyes [33], textile dye [21,26,34,35] from aqueous solutions. Despite of this, were not found report of studies on the use of defatted microalgal biomass for the removal of leather dyes.

In this context, the aim of the present study was to investigate the potential application of defatted microalgal biomass (DMB), cultivated in tannery wastewater, as a biosorbent for the removal of Acid Blue 161 (AB-161) dye, which is largely used in the leather industry. Zeta Potential, FTIR, SEM, Optical microscopy micrographs and BET and BJH, characterized the biosorbent. Influences of pH, kinetics, equilibrium and mechanism studies were carried out in order to elucidate the adsorption process of dye onto DMB. The adsorbents were used for treatment dye aqueous solutions and tannery effluent.

7.2 MATERIALS AND METHODS

7.2.1 Solutions and reagents

The dye used as adsorbate Acid Blue 161 (AB-161; C.I. 15706; CAS number 12392-64-2; chemical formula is $C_{20}H_{13}N_2O_5SNaCr$; molecular weight = $394.40 \text{ g mol}^{-1}$), was obtained from chemical company Lanxess (São Leopoldo, RS-Brasil) as a commercially available leather dye. It belongs to the azo dye group, whose the molecular structure is shown in Figure 7.1. Azo dyes are extensively used in the tannery industry [36]. The stock solution (2.00 g.L^{-1}) was prepared by dissolving the dye in distilled water. The working solutions were obtained by diluting the dye stock solution to the required concentrations. To adjust the pH of the solutions, 0.50 mol.L^{-1} sodium hydroxide or chloric acid were used.

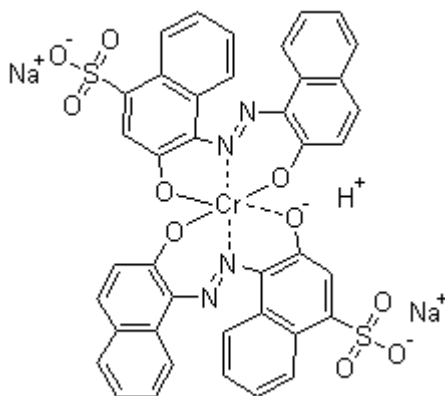


Figure 7.1. Chemical structure of the Acid Blue 161

7.2.2 Adsorbents preparation and characterization

The adsorbent used in this research was the residual biomass of the microalgae *Scenedesmus* sp. after lipid extraction (defatted microalgal biomass – DMB). The microalgae was cultured in 3 L photobioreactors containing tannery effluent without pretreatment (beamhouse stage effluent) for 20 days. At the end of cultivation, the biomass was recovered by centrifugation and freeze-dried.

Lipid extraction was performed using the organic solvents chloroform:methanol:water (2:2:1.8 v/v). After extraction, the biomass was washed with distilled water, centrifuged and dried in an oven for 12 hours at 80 °C. The dry biomass was macerated for homogenization of the biosorbent and was characterized by vibrational spectroscopy in the infrared region with Fourier transform (FTIR). The spectra were obtained with a resolution of 4 cm⁻¹ with 100 cumulative scans using a Varian spectrometer, model 640-IR. The surface physical morphology of the biosorbent was observed by a scanning electron microscope (JSM 6060 – JEOL) and by microscopy (Olympus SZX16 stereomicroscope). N₂ adsorption–desorption isotherm measurements were carried out at 77 K (-196 °C) using an adsorption analyzer (Gemini 2375 Micrometer), at a relative pressure (P/P₀) from 0 to 0.99. The specific surface area were determined from the Brunauer, Emmett and Teller (BET) multipoint method and the pore size distribution were obtained using Barret, Joyner, and Halenda (BJH) method.

Zeta potential measurements were conducted using a Zetasizer NANO-Z (Malvern Instruments Limited, UK) equipped with a He–Ne laser (633 nm). The intensity of the scattered light was measured at the scattering angle of 173°. For the analysis, the particles were suspended in ultrapure water by sonication for 10 minutes at a concentration of 1 mg mL⁻¹. For potentiometric titration, the pH was adjusted with

0.25 M HCl and NaOH from 0.25 to 0.01 mol.L⁻¹ The software uses the Smoluchowski approximation to calculate the zeta potential value [37].

7.2.3 Adsorption studies

To evaluate the effect of pH, 20.0 mg of adsorbent were placed in 15 mL Falcon flasks containing 10.0 mL of the dye solutions (100 mg.L⁻¹) over a range of pH values from 2 to 11, and were agitated for a period of time of 24 h using an rotary shaker operating at 250 rpm and temperature of 25 °C.

In order to separate the adsorbent from the aqueous solutions the flasks were filtered. The dye concentration in the filtered solution was measured using a UV/Visible spectrophotometer (Model: UV/1800A, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan). Absorbance values were recorded at the wavelength of maximum absorbance ($\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$) of dye, which was 578 nm. The adsorption capacity and the percentage dye removal were calculated by Eqs. (1) and (2), respectively:

$$q = \frac{(C_o - C_f).V}{m} \quad (1)$$

$$\% \text{removal} = \frac{(C_o - C_f)}{C_o} . 100 \quad (2)$$

where q is the amount of dye adsorbed by the adsorbent (mg.g⁻¹), C_o is the initial dye concentration put in contact with the adsorbent (mg.L⁻¹), C_f is the dye concentration after the batch adsorption procedure (mg.L⁻¹), V is the volume of dye solution (L) put in contact with the adsorbent and m is the mass (g) of adsorbent.

Once the optimum pH value was identified, the effects of dosage adsorbent, contact time and temperature effect were conducted under these same conditions.

In the sorbent dosage assay different quantities of dried defatted microalgal biomass, (0.005 to 0.04 g) were used in 10 ml of dye solution at a concentration of 100 mg.L⁻¹, with the best pH condition found previously.

The influence of contact time on adsorptive removal of dye from aqueous phase was investigated using the best adsorbent dosage found in previously dosage tests in solutions with concentrations of 200 and 400 g.L⁻¹ at different contact time intervals from 5 to 540 min.

The kinetic models Pseudo-first order, Pseudo second-order and general order kinetic model, as shown in Eqs. (3) – (5), respectively, were used to explain the kinetic studies.

$$q_t = q_e [1 - \exp(-k_f \cdot t)] \quad (3)$$

$$q_t = q_e - \frac{q_e}{[k_s(q_e) \cdot t + 1]} \quad (4)$$

$$q_t = q_e - \frac{q_e}{[k_N(q_e)^{n-1} \cdot t \cdot (n-1) + 1]^{1/(n-1)}} \quad (5)$$

where q_e is the amount of adsorbate adsorbed at the equilibrium ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), q_t is amount of adsorbate adsorbed at time t ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), k_f is pseudo-first-order rate constant (min^{-1}), k_s is pseudo-first-order rate constant ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), k_N is General-order rate constant ($\text{h}^{-1}(\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}) \cdot n^{-1}$) and n is the adsorption reaction order with regard to the effective concentration of the adsorption sites available on the surface of adsorbent.

The equilibrium models tested in this work were: Langmuir and Freundlich models (see Eqs. (6 and 7):

$$q_e = \frac{Q_{\max} \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (6)$$

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n_F} \quad (7)$$

where Q_{\max} is maximum adsorption capacity of the adsorbent, Langmuir Isotherm ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), K_L is Langmuir equilibrium constant ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$), C_e is dye concentration at the equilibrium ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), K_F is Freundlich equilibrium constant ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})^{-1/n_F}$) and n^F is dimensionless exponent of the Freundlich equation.

The statistical evaluation of the kinetic and isotherm parameters, kinetic and equilibrium data were fitted using nonlinear methods using the software Microcal Origin 9.0. A determination coefficient (R^2), an adjusted determination coefficient (R^2_{adj}) and the standard deviation (SD) were jointly used to evaluate the suitability of the models. SD is the differences between the theoretical and experimental amounts of dye adsorbed. The R^2 , R^2_{adj} and SD are depicted in Eqs. (8) – (10), respectively.

$$R^2 = \left(\frac{\sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - \bar{q}_{i,\text{exp}})^2 - \sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - q_{i,\text{model}})^2}{\sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - \bar{q}_{i,\text{exp}})^2} \right) \quad (8)$$

$$R_{adj}^2 = 1 - (1 - R^2) \cdot \left(\frac{n-1}{n-p} \right) \quad (9)$$

$$SD = \sqrt{\left(\frac{1}{n-p} \right) \cdot \sum_i^n (q_{i,\text{exp}} - q_{i,\text{model}})^2} \quad (10)$$

where $q_{i,\text{model}}$ is the value of q predicted by the fitted model and $q_{i,\text{exp}}$ is the value of q measured experimentally, $\bar{q}_{i,\text{exp}}$ is the average of q experimentally measured, n is the number of experiments performed, and p is the number of parameter of the fitted model.

7.2.4 Adsorption in Tannery Effluent

To evaluate the efficacy of adsorption onto DMB in tannery wastewater, wastewater was collected from wet-end processing of leather in laboratory. The effluent was performed using wet-blue leather (chromium-tanned leather) from bovine hide and the wet-end processing was carried out using a laboratory-scale drum (Mathis – LFA model), Following the wet-end formulation described:

In the Soaking the piece (150 g) of wet-blue leather were treated with 200% water and 0.2% surfactant for 30 minutes, after the bath was drained off.

New deacidification bath was carried with 100% water, 2% sodium formiate, 0.5% sodium bicarbonate and 1% sulfonated neutralizing agent for 60 minutes and then was drained off. Washing with 200% water was performed and drained off.

The Fatliquoring–Retanning–Dyeing I was carried with 150% water, 6% synthetic oils, 9% retanning agents, 1% dye auxiliary, 2% anionic dye, 2% formic acid for 250 minutes. After, this bath was drained off and then another washing was performed.

The Dyeing II bath containing 100% water, 1.5% anionic dye, 1% dye auxiliary and 1% formic acid rotating in the drum for 45 minutes. A final washing with 200% water was performed. The tannery wastewater was characterized by analyzes of pH, total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN).

7.3 RESULTS AND DISCUSSION

7.3.1 Characterization of the biosorbent

FTIR analysis was performed to determine the nature of the functional groups present on the surface of the biomass responsible by leather dye binding. Fig. 7.2 shows the infrared spectra for the biosorbent in two different forms: defatted microalgal biomass and dye-defatted microalgal biomass (after the adsorption test with the Acid Blue 161 dye.). The different transmittance peaks show the complex nature of the biomass (heterogeneity of the material). The FTIR spectra show a broad band between 3000 and 3600 cm^{-1} corresponding to the hydroxyl vibration (-OH) of glucose, the amino groups (-NH) and the stretching of carboxylic groups. These groups are associated with the presence of polysaccharides and proteins in the cell wall of the biosorbent. The band observed between 3000 and 2800 cm^{-1} could be assigned to the -CH stretch of -CH₃ and -CH₂ groups [38,39]. Peaks at 1740 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} and 1420 cm^{-1} correspond to the bands of the carboxylic functional group. The transmittance peaks around 1160 cm^{-1} correspond to the stretching of the SO₃ bonds [31]. For the biomass spectrum after the adsorption assay with the dye, a shift in the aforementioned bands is observed, thus indicating the interaction of the dye with these functional groups.

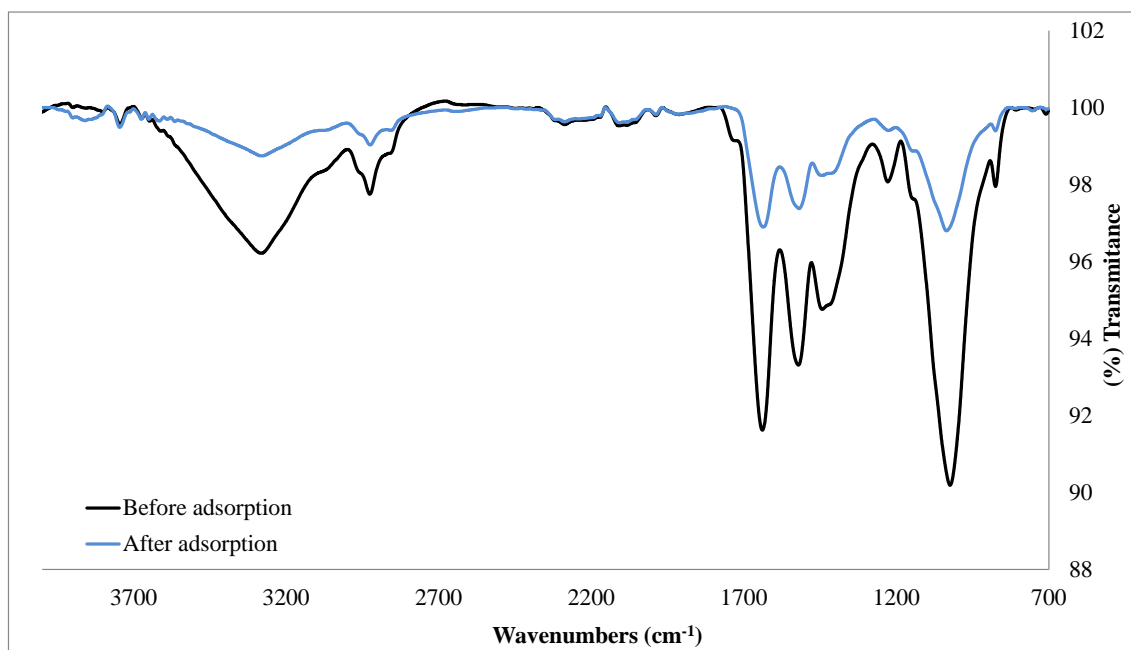


Figure 7.2. Spectrum FTIR of the biosorbent DMB before and after the adsorption of AB-161 dye

Figure 7.3 shows the morphological (SEM image) details of the defatted microalgal biomass surface (biosorbent) before (Fig 7.3a) and after (Fig 7.3b) dye sorption. From the Figure 7.3a it's possible to see that the texture of the biosorbent reveals an irregular surface roughness with cavities that plays an important role in the adsorption of the dye. Lipid extraction of biomass through solvent leads to harsh effects like breaking of cell wall which may cause such surface topology. After the biosorption process (Fig 7.3b) a more uniform material was observed with a decrease in the number of cavities on the biosorbent surface. Thus indicating the covering of the cavities by the AB-161 dye. In addition to that, comparing the Fig 7.3a and b it's possible to notice an increase in the size of the biosorbent after the adsorption, this difference size indicates the sorption of the AB-161 dye into the adsorbent.

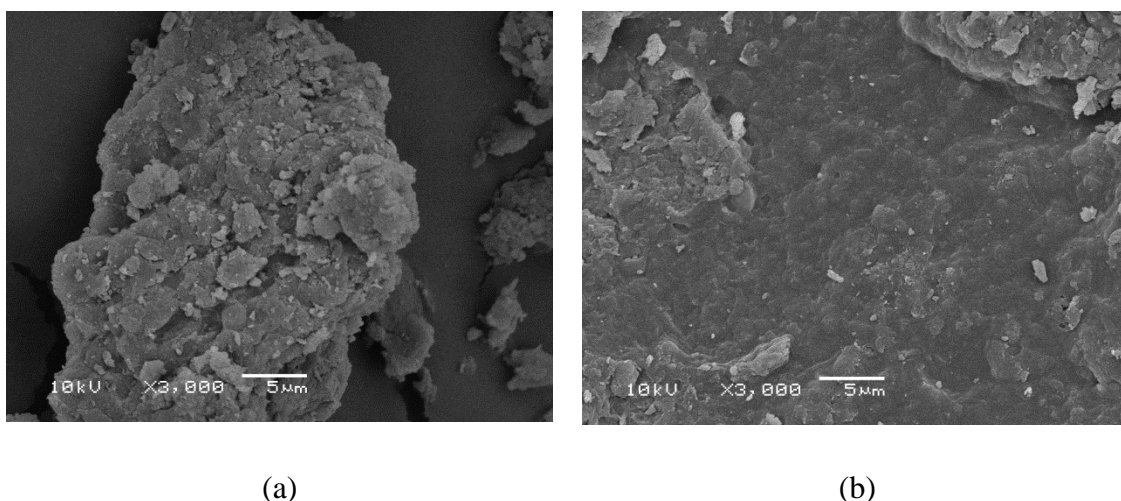


Figure 7.3. SEM Micrographs of biosorbent DMB (a) before biosorption 3000x and (b) after biosorption 3000x

Figure 7.4 shows the biosorbent before (Fig. 7.4a and c) and after (Fig. 7.4b and d) dye sorption observed in stereomicroscope. It is clear from Fig. 7.4 that a change in coloration occurred, a darkening of the surface of the biosorbent due to sorption of the AB-161 dye.

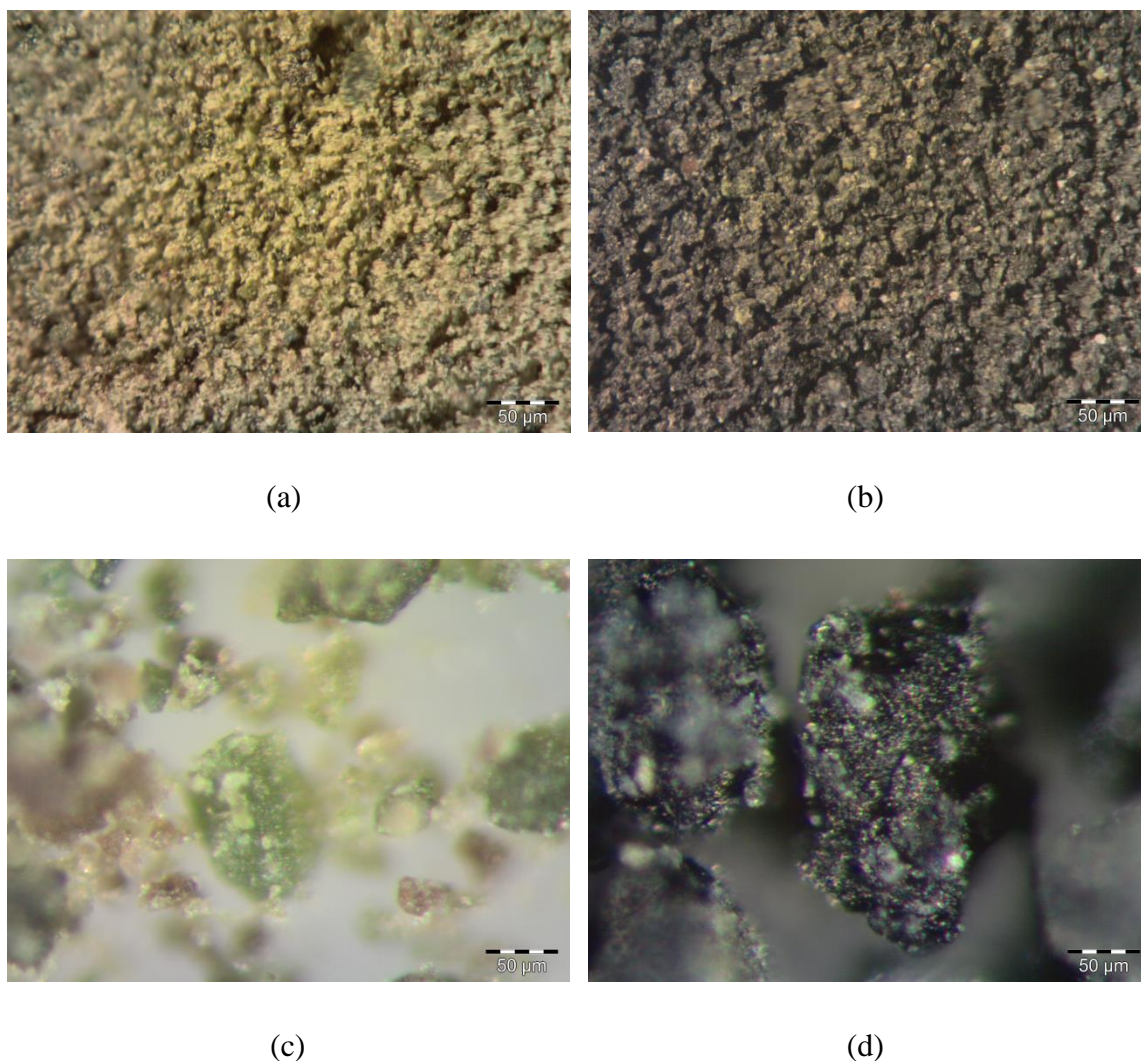


Figure 7.4. Optical microscopy micrographs of biosorbent DMB (a) before 2x (b) after 2x (c) before 20x and (d) after 20x dye sorption.

Figure 7.5a shows the N₂ adsorption/desorption isotherm of DMB at 77.4 K, presenting a behavior of type IV, according to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) classification, which is characteristic of mesoporous solids. The H3- type hysteresis loop was observed. This type loop does not exhibit any limiting adsorption at high p/p₀, and is observed with aggregates of plate-like particles giving rise to slit-shaped pores [40]. The pore size distribution model for the DMB confirmed the presence of mesopores with diameter range from 30 to 450 Å (Fig. 7.5b). The surface area, total pore volume and average pore diameter of biosorbent DMB were determined by BET and BJH methods and the values are presented in Table 7.1.

The surface area of 3.47 m².g⁻¹ observed for the defatted biomass of the microalgae *Scenedesmus* sp is higher than that found by Maurya [41] of 1.46 m².g⁻¹ for

the defatted biomass of the microalgae *Microspora* sp. and similar to that found by Cardoso [21] of $3.51 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ for the intact microalga *Spirulina platensis*. The total pore volume of $8.02 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ was higher than that found in the cited studies where both found a value of $4 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. However, the value of Average pore diameter of 66.3 \AA was considerably lower than that verified by Maurya [41], of 224.6 \AA .

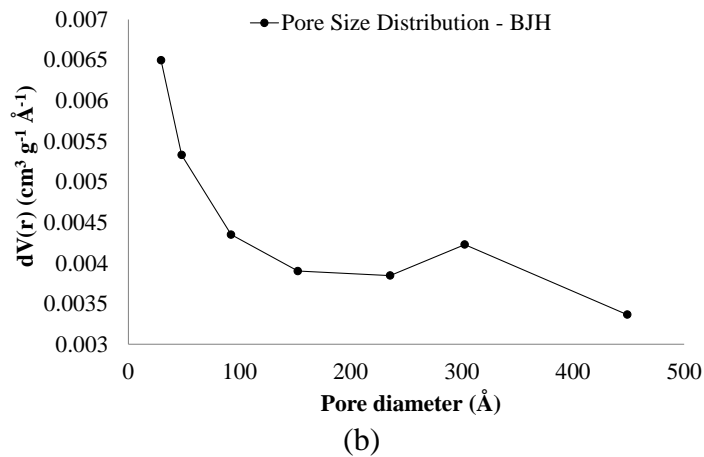
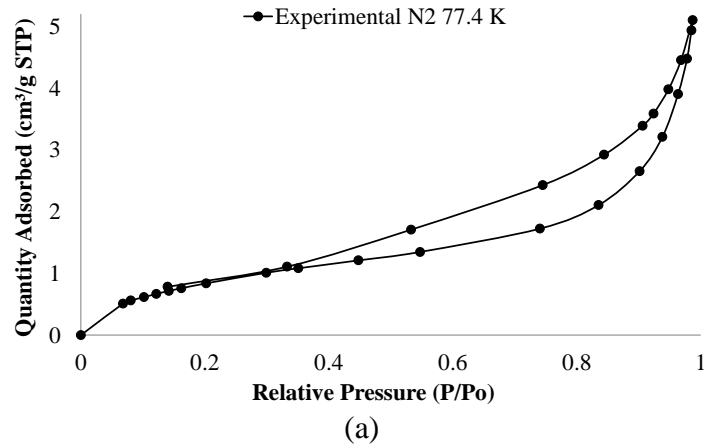


Figure 7.5. (a) Nitrogen adsorption–desorption isotherms and (b) pore size distribution for the DMB

Table 7.1. Physical and chemical properties of the adsorbent

Adsorbent	Surface Area ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Total pore volume ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Average pore diameter (\AA)
DMB	3.47	8.02×10^{-3}	66.3

7.3.2 Effects of pH

Figure 7.6 shows the initial pH effects (with intervals between 2 and 11) on the percentage of removal and amount of adsorbate adsorbed per gram of adsorbent from AB-161 dye by the defatted biomass *Scenedesmus* sp. The pH is one of the most

important factors that influence the adsorption of a dye on a solid adsorbent [42]. Different dyes will have different pH ranges depending on the adsorbent used. In this assay the AB-161 dye did not show any color changes in the pH fix of 2.0-11.0. The removal percentage was practically unchanged (approximately 70%) in the pH range from 2.0 to 3.0. An alkaline pH of 11 showed very low dye removal by dry biomass, only 8.30%. High removal percentage of 90.96% and 90.09% were observed for pHs 4 and 7, respectively. The maximum adsorption capacity of AB- 161 was 40.58 and 38.43 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) in pH 4 and 7 respectively.

The pH_{pzc} of DMB biosorbent confirm the ranges of optimal pH values for AB-161 dye removal from aqueous solutions (Fig. 7.7). The pH where the electrokinetic potential (zeta potential) is equal to zero is called the zero charge point (pH_{pzc}) and can be used as a qualitative parameter of load balance on the surface of the adsorbent. Figure 7.7 shows the variation of this potential as a function of pH, indicating the PCZ at a pH value of 4.20. For pH values lower than pH_{pzc} the adsorbent presents a positive surface charge [20,42]. The dissolved AB-161 dye is negatively charged in water solutions [27]. The adsorption of the AB-161 dye takes place when the adsorbent present a positive surface charge ($\text{pH} < 4.2$), however for $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$ with zeta potential near zero was verified good dye removal.

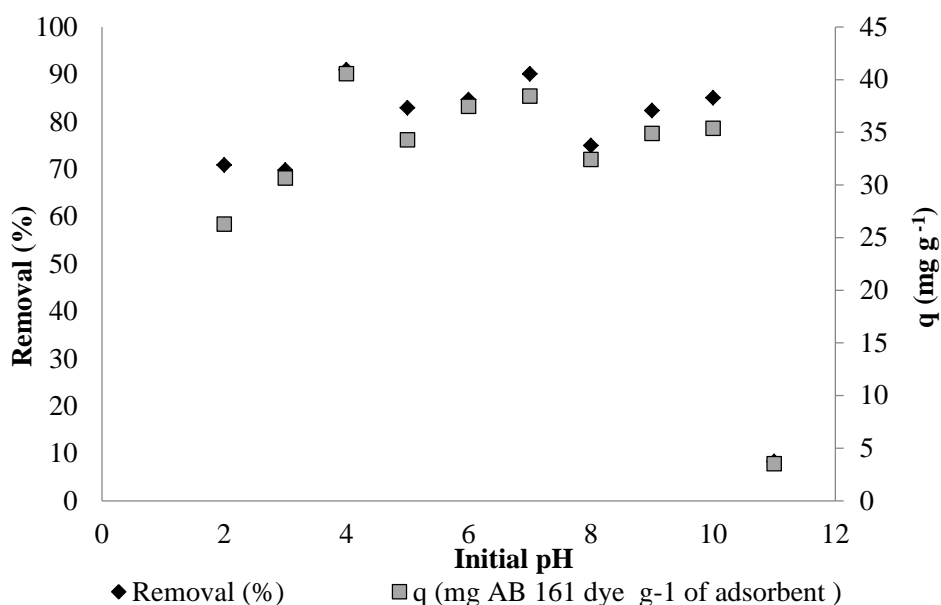


Figure 7.6. Effects of pH in the AB-161 dye removal and in amount of dye adsorbed by the DMB

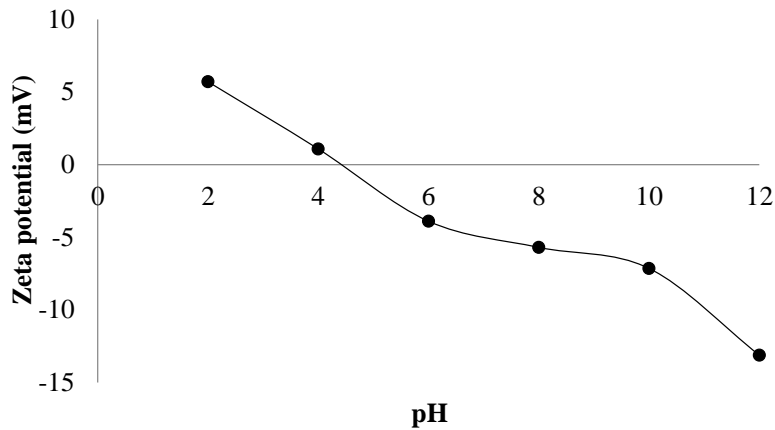


Figure 7.7. Zeta potential of biosorbent DMB as a function of pH

As the pH of the dyeing bath (step of the processing of the leather in which the dyes are added) is slightly acidified it was decided to set the pH value to 4 for the next tests.

7.3.3 Effects of biosorbent dosage

Figure 7.8 shows the comportment of dye removal with the different biosorbent dosage. According to Figure 8 it is observed that the adsorption of the AB-161 dye increased with increasing amount of biosorbent, reaching a maximum equilibrium value in 0.03 g of defatted microalgal biomass (94.45% removal). So the adsorbent dosage was set at 0.03 g and pH of 4 for the next kinetic and adsorption isotherm tests.

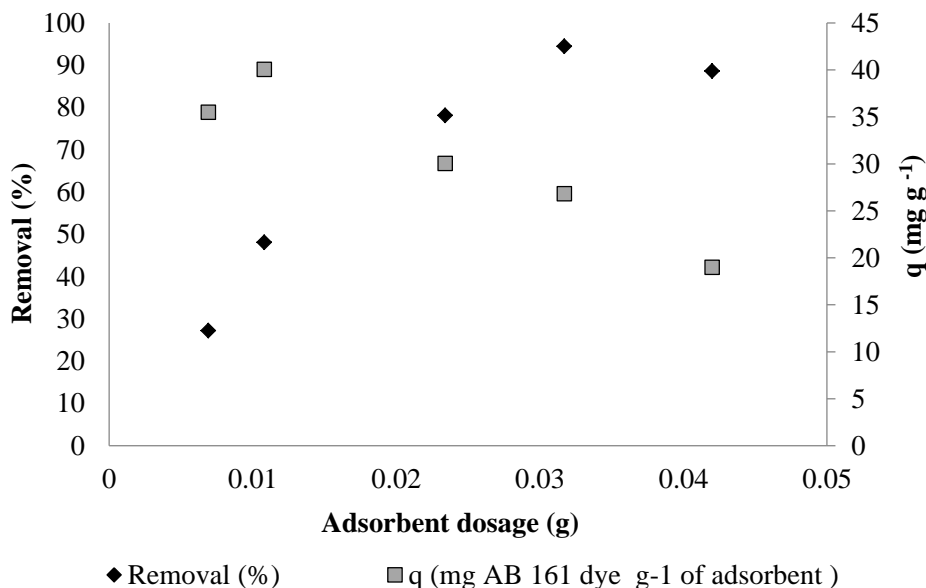


Figure 7.8. Effects of biosorbent dosage in the AB-161 dye removal and in amount of dye adsorbed by the DMB

7.3.4 Kinetic studies

In order to investigate the biosorption mechanism and to determine the minimum time to achieve the equilibrium of AB-161 dye on to DMB, pseudo-first order, pseudo-second order and general order kinetic adsorption models were tested, as shown in Figure 7.9. The kinetic parameters for the three kinetic models are presented in Table 7.2.

In consideration that the experimental data were fitted to kinetic models, previously mentioned, the parameter residual standard deviation (SD) was used to evaluate the fitting of the experimental data. The smaller values of SD indicate a better fit between the theoretical and experimental data [20,43]. It was found that the minimum SD values, 1.4726 mg.g⁻¹ for concentrations of 200.0 mg.L⁻¹ and 1.7465 mg.g⁻¹ for concentrations of 400.0 mg.L⁻¹, were obtained with the general order kinetic model. The pseudo-first order kinetic model presented SD values ranging from 1.5268 to 4.4209 mg.g⁻¹. Also, for the pseudo-second order model, the SD values ranged from 2.5640 to 2.7698 mg.g⁻¹. In addition to the lower residual standard deviation the high correlation coefficients ($R^2 = 0.9922$ and 0.9884) also demonstrate that the general order kinetic model provides a good theoretical correlation to the adsorption equilibrium data of the AB-161 dye by defatted biomass of the microalgae *Scenedesmus* sp..

Adsorption kinetic studies in the treatment of aqueous effluents provide valuable information on the mechanism of the adsorption process [44]. In the investigated influence of contact time, it can be observed that the percentage uptake increase with time and, at some point in time, reach a constant value where no more dye was removed from the solution. At this point, the amount of dye being adsorbed onto the adsorbent is in a state of dynamic equilibrium with the amount of dye desorbed from the adsorbent. The time required to attain this state of equilibrium is termed the equilibrium time and the amount of dye adsorbed at the equilibrium time reflected the maximum dye adsorption capacity of the adsorbent under these particular conditions [45]. In this study, the results showed that the lowest contact time between the AB-161 dye and the DMB biosorbent to reach the maximum adsorption capacity was observed in 240 min and 300 min for the initial concentration of 200 and 400 mg.L⁻¹, respectively.

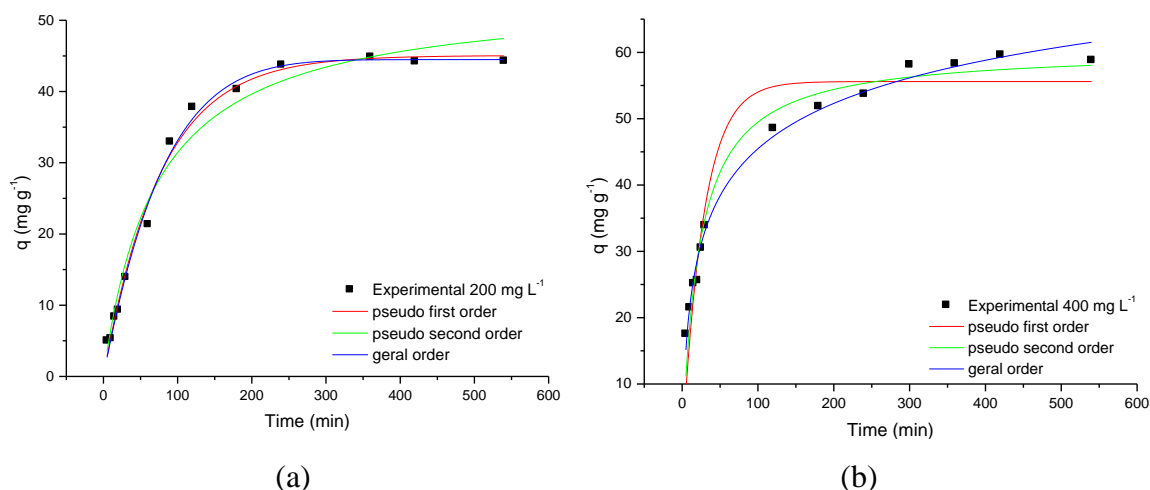


Figure 7.9. Kinetic models of adsorption of (a) AB-161 dye at 200.0 mg.L⁻¹ and (b) AB-161 dye at 400.0 mg.L⁻¹ on DMB. Conditions: initial pH, 4.0; temperature, 25 °C; adsorbent mass, 0.03 g.

Table 7.2. Kinetic parameters for the adsorption of AB-161 from DMB. Conditions: temperature, 25°C; pH, 4.0; mass of adsorbent, 0.03 g.

	Concentration (mg.L ⁻¹)	
	200.0	400.0
<i>Pseudo-first-order</i>		
k_f (min ⁻¹)	0.0130	0.0356
q_e (mg.g ⁻¹)	45.0552	55.5985
R^2_{adj}	0.9916	0.9258
SD (mg.g ⁻¹)	1.5268	4.4209
<i>Pseudo-second-order</i>		
k_s (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	2.63×10^{-4}	7.50×10^{-4}
q_e (mg.g ⁻¹)	53.6652	60.4068
R^2_{adj}	0.9763	0.9709
SD (mg.g ⁻¹)	2.5640	2.7698
<i>General-order</i>		
k_N (h ⁻¹ .(g.mg ⁻¹) ⁿ)	0.0218	2.22×10^{-28}
q_e (mg.g ⁻¹)	44.4774	167.0981
N	0.85	12.7849
R^2_{adj}	0.9922	0.9884
SD (mg.g ⁻¹)	1.4726	1.7465

7.3.5 Equilibrium studies

In this study, the Langmuir [46] and Freundlich [47] equilibrium isotherm models were investigated in order to describe the relationship between the amount of adsorbate-adsorbed by the adsorbent (q_e) and the adsorbate concentration remaining in the solution after equilibrium is reached (C_e), keeping the temperature of the process constant [48]. Figure 7.10 shows the adsorption isotherms carried out from 25 °C and

40 °C with AB-161 dye on the adsorbent DMB, using optimum experimental conditions previously emphasized (see Table 7.3).

The Langmuir model is based on the principle that adsorption occurs on a homogeneous monolayer surface where each site can only hold one adsorbate species and all sites are energetically equivalent. In this isotherm model there are no interactions between the adsorbate species. The Freundlich model assumes a multilayer adsorption, with nonuniform distribution of energy over the heterogeneous surface, where the concentration of the adsorbate on the adsorbent surface increases with the adsorbate concentration. Theoretically, using this expression, an infinite amount of adsorption can occur [49].

Considering that for a good fitting of an isotherm model, the SD values should be $\leq 3.0\%$ [27], based on this confident limit, a better adjustment of the Freundlich model is observed for both temperatures studied.

The Freundlich model showed (Figure 7.10 and Table 7.3) the lowest SD values (1.4737 and 2.2664 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for the 25 and 40 °C temperature, respectively), which means that the q fit by the isotherm model was close to the q measured experimentally. The maximum amount adsorbed from AB-161 dye by DMB were of 83.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to the highest temperature from 40 °C and 75.78 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ to the temperature of 25 °C.

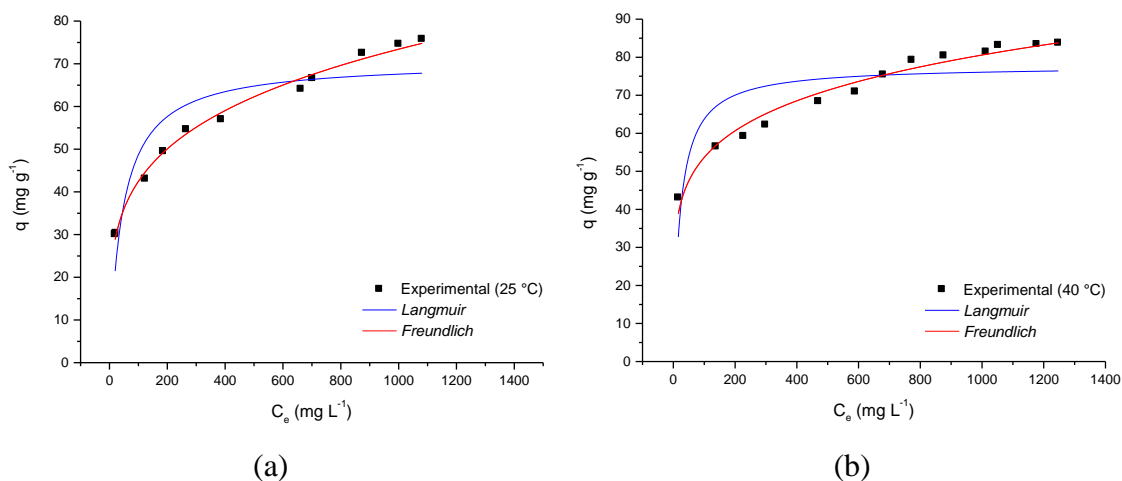


Figure 7.10. Adsorption isotherms of AB-161 from DMB in aqueous solution at (a) 25 °C and (b) 40 °C temperature. Conditions: initial pH, 4.0; temperature, 25 °C; adsorbent mass, 0.03 g.

Table 7.3. Isotherm parameters for the adsorption of AB-161 from DMB.
Conditions: pH, 4.0; mass of adsorbent, 0.03 g.

Isotherm parameters	Temperature	
	25 °C	40 °C
Langmuir		
Q_{\max} (mg.g ⁻¹)	70.6129	77.7278
K_L (L.mg ⁻¹)	0.0222	0.0454
R^2_{adj}	0.8065	0.5973
SD (mg.g ⁻¹)	7.2741	8.1109
Freundlich		
K_F (mg.g ⁻¹ .(mg.L ⁻¹) ^{-1/nF})	14.1989	23.8017
n_F	4.2043	5.6646
R^2_{adj}	0.9920	0.9685
SD (mg.g ⁻¹)	1.4737	2.2664

7.3.6 Thermodynamic studies

To determine the thermodynamic parameters of the adsorption process of AB-161 dye onto the DMB biosorbent, batch adsorption experiments were performed at two different adsorption temperatures 25 e 40 °C. The Gibb's free energy change (ΔG° , kJ.mol⁻¹), enthalpy change (ΔH° , kJ.mol⁻¹) and entropy change (ΔS° , J.mol⁻¹.K⁻¹) were determined using Equations 11, 12 and 13.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S \quad (11)$$

$$\Delta G^\circ = -RTL\ln(K) \quad (12)$$

The combination of Equations 11 and 12 gives Equation 13:

$$\ln(K) = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (13)$$

where R is the universal gas constant (8.314 J.K⁻¹.mol⁻¹), T is the absolute temperature (Kelvin) and K represents the equilibrium adsorption constants of the fitted isotherm (K). The ΔH° and ΔS° values were calculated from the linearized plot of Vant Hoff 's equations of $\ln(K)$ versus $1/T$. The calculated values of ΔG° , ΔH° , and ΔS° are listed in Table 7.4.

The negative value of the change of free energy (ΔG°) confirms the feasibility of the adsorption process and also indicates spontaneous adsorption of AB-161 dye by the DMB in both temperatures studied. The positive values of ΔH° indicate that the adsorption is an endothermic process. Moreover, the type of interaction of an adsorbate on a given adsorbent can be classified by the magnitude of the change in enthalpy. The ΔH values of 26.14 kJ.mol⁻¹ indicate a physisorption phenomenon with electrostatic

interaction [50,51]. The positive values of ΔS° confirmed the preference of AB-161 molecules for the surface of DMB, and suggested an irregular increase of the dye at the biosorbent-solution interface during the adsorption [52].

Table 7.4. Thermodynamic parameters for the adsorption of AB-161 with DMB

Thermodynamic parameters	Temperature	
	25 °C	40 °C
ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	-39.04	-42.32
ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	26.14	
ΔS° (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	218.74	

7.3.7 Treatment of Tannery Effluent

The UV-vis spectra of the effluent before and after treatment with DMB were recorded from 400 to 800 nm (Fig. 7.11). The area under the absorption band was used to monitor the percentage of the dye mixture removed from the tannery effluent. In this assay a dye removal in the tannery effluent of 69.83% was observed.

In addition to dye removal, the pH, total organic carbon (TOC) and total nitrogen (TN) were also investigated (Table 7.5). In these assays, there was a significant increase of the pH, from 4.86 to 5.32. However, a reduction of organic (50.78%) and nitrogen (19.80%) compounds after the adsorption tests in tannery effluent with the DMB biosorbent was verified.

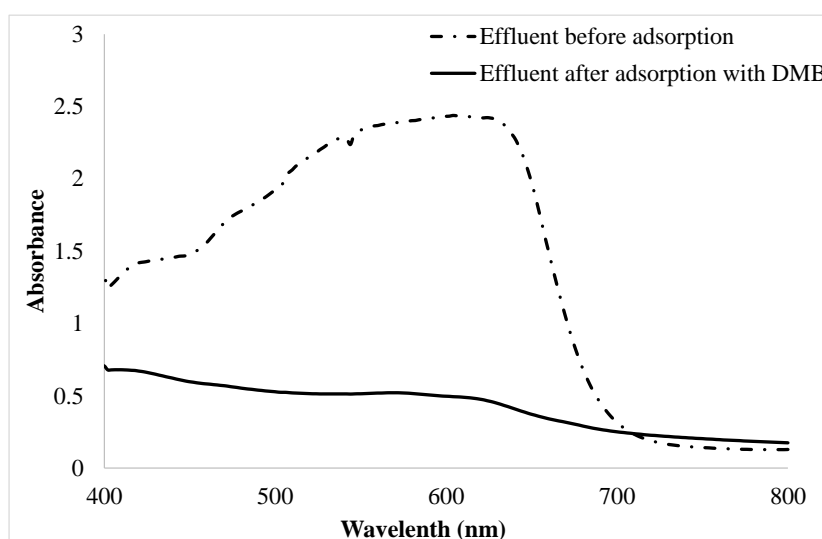


Figure 7.11. UV-vis spectra of tannery effluent before and after adsorption with DMB

Table 7.5. Characterization of tannery effluent before and after adsorption with DMB

	Effluent before adsorption	Effluent after adsorption with DMB
pH	4.86	5.32
TOC (mg.L ⁻¹)	3171.51	1561.00
TN (mg.L ⁻¹)	264.60	212.20

7.4 CONCLUSION

From the results present in this study, the DMB biosorbent to be an efficient sorbent for removal of AB-161 dye from aqueous solutions and leather wastewater. Through SEM, FTIR and Optical microscopy micrographs analysis was possible to characterize the proposed biosorbent. The lowest contact time between the AB-161 dye and the DMB to achieve the equilibrium were 240 min and 300 min for the initial concentration of 200 and 400 mg.L⁻¹, respectively at pH 4.0. The adsorption kinetic of AB-161 dye was well described by the general order kinetic model. The Freundlich model was the best to fitting the isotherm data, showing multilayer coverage of dye molecules at the outer surface of DMB. The maximum amounts of AB-161 dye adsorbed at 25 °C was 75.78 mg.g⁻¹ and 40 °C was 83.2 mg.g⁻¹. From the thermodynamic parameters for the adsorption of AB-161 with DMB indicated a spontaneous endothermic process with a physical reaction by electrostatic interaction.

For the treatment of tannery effluents, DMB adsorbents presented good performance, removing 69.83% of AB-161 dye, 50.78% of TOC and 19.80% of TN. Therefore, the use of defatted microalgal biomass for treatment of the tannery effluent could be economically feasible, since this biosorbent is a residue of the biofuels industry.

7.5 Acknowledgments

We would like to thank to the scholarships provided by Brazilian Federal Agency for the Scholarship (CAPES) and to Financier of Studies and Projects (FINEP) – public call MCTI/FINEP CT-HIDRO 01/2013.

7.6 REFERENCES

- [1] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 294–306.
- [2] P.S Kumar, J. Pavithra, S. Suriya, M. Ramesh, K.A Kumar, *Sargassum wightii*, a marine alga is the source for the production of algal oil, bio oil, and application in the dye wastewater treatment, *Desalin. Water Treat.* 55 (2014) 1342-1358.

- [3] J.H. Park, J.Y. Jeong, D. Hee, J.L. Dong, H.K. Sang, Anaerobic digestibility of algal bioethanol residue, *Bioresource Technol.* 113 (2012) 78–82.
- [4] A. Ward, D. Lewis, Pre-treatment options for halophytic microalgae and associated methane production, *Bioresource Technol.* 177 (2015) 410–413.
- [5] N. Rashid, M.S.U. Rehman, J.I. Han, Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels, *Biochem. Eng. J.* 75 (2013) 101–107.
- [6] N. Maurya, A. Mittal, P. Corner, E. Rother, Biosorption of dyes using dead macro fungi: effect of dye structure, ionic strength and pH, *Bioresource Technol.* 97, (2006) 512–521.
- [7] J.S. Piccin, L. A. Feris, M. Cooper, M. Gutterres, Dye adsorption by leather waste: mechanism diffusion, nature studies, and thermodynamic data, *J. Chem. & Eng. Data* 58 (2013) 873–882.
- [8] S. Ortiz-Monsalve, J. Dornelles, E. Poll, M. Ramirez-Castrillón, P. Valente, M. Gutterres, Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. *Process Saf and Environ Prot.* 109 (2017) 437–451.
- [9] F.M. Machado, C.P. Bergmann, E.C. Lima, B. Royer, F.E. de Souza, I.M. Jauris, T. Calvete, S.B. Fagan, Adsorption of Reactive Blue 4 dye from water solutions by carbon nanotubes: experiment and theory, *Phys. Chem.* 14 (2012) 11139–11153.
- [10] N.F. Cardoso, E.C. Lima, T. Calvete, I. S. Pinto, C.V. Amavisca, T.H.M. Fernandes, R.B. Pinto, W.S. Alencar, Application of aqai stalks as biosorbents for the removal of the dyes Reactive Black 5 and Reactive Orange 16 from aqueous solution, *J. Chem. Eng. Data* 56 (2011) 1857–1868.
- [11] M. Gutterres, B. Mella, Chapter 16: Chromium in Tannery Wastewater, Book *Heavy Metals in Water: Presence, Removal and Safety*, Springer Publisher, Londres, 2014.
- [12] V. Vadivelan, K.V. Kumar, Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk. *J. Colloid. Interf. Sci.* 286 (2005) 90–100.
- [13] S. Karaca, A. Gürses, M. Açikyildiz, M.E. Korucu, Adsorption of cationic dye from aqueous solutions by activated carbon. *Micropor. Mesopor. Mat.* 115 (2008) 376–382.
- [14] N. Kannan, M.M. Sundaram, Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption on various carbons a comparative study. *Dyes Pigments* 51 (2001) 25–40.
- [15] D.C. Santos, M.A. Adebayo, E.C. Lima, S.F.P. Pereira, R. Cataluña, C. Saucier, P.S. Thue, F.M. Machado, Application of carbon composite adsorbents prepared from coffee waste and clay for the removal of reactive dyes from aqueous solutions. *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 924-938.

- [16] C. Gomes, J.S. Piccin, M. Gutteres, Optimizing adsorption parameters in tannery-dye-containing effluent treatment with leather shaving waste, *Process Saf. Environ.* 99 (2016) 98–106.
- [17] M.J. Puchana-Rosero M.A. Adebayo, E.C. Lima, F.M. Machado, P.C. Thue, J.C. Vaguetti, C.S. Umpierres, M. Gutteres, Microwave-assisted activated carbon obtained from the sludge of tannery-treatment effluent plant for removal of leather dyes. *Colloid Surf A: Physicochem Eng. Asp.* 504 (2016) 105–115.
- [18] F.M. Machado, A.C. Sophia, E.C. Lima, S.L.P. Dias, L.D.T. Prola, C. Saucier, I.M. Jauris, I. Zanella, S.B. Fagan, Adsorption of Alizarin Red S dye by carbon nanotubes - an experimental and theoretical investigation. *J. Phys. Chem.* 120 (2016) 18296–18306.
- [19] J.S. Piccin, C.S. Gomes, B. Mella, M. Gutteres, Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 1061–1067.
- [20] T. Calvete, E.C. Lima, N.F. Cardoso, J.C.P. Vaghetti, S.L.P. Dias, F.A. Pavan, Application of carbon adsorbents prepared from Brazilian-pine fruit shell for the removal of reactive orange 16 from aqueous solution: kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. *J. Environ. Manage.* 91 (2010) 1695–1706.
- [21] N.F. Cardoso, E.C. Lima, B.M. Royer, V. Bach, G.L. Dotto, L.A. Pinto, T. Calvete, Comparison of *Spirulina platensis* microalgae and commercial activated carbon as adsorbents for the removal of Reactive Red 120 dye from aqueous effluents, *J. Hazard Mat.* 241 (2012) 146-153.
- [22] R.M.C. Somasekhara, L. Sivaramakrishna, R.A. Varada, The use of an agricultural waste material, Jujuba seeds for the removal of anionic dye (Congo red) from aqueous medium, *J. Hazard. Mater.* 203 (2012) 118–127.
- [23] R.L. Tseng, S.K. Tseng, F.C. Wu, Preparation of high surface area carbons from corncob with KOH etching plus CO₂ gasification for the adsorption of dyes and phenols from water, *Colloid Surf. A.* 279 (2006) 69–78.
- [24] C.T. Weber, E.L. Foletto, L. Meili, Removal of tannery dye from aqueous solution using papaya seed as an efficient natural biosorbent, *Water Air Soil Pollut.* 224 (2013) 1427-1438.
- [25] M.J. Puchana-Rosero, E.C. Lima, S. Ortiz-Monsalve, B. Mella, D. da Costa, E. Poll, M. Gutteres, Fungal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye in aqueous solution, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2016) 4200-4209.
- [26] T.S. Chandra, S.N. Mudliar, S. Vidyashankar, S. Mukherji, R. Sarada, K. Krishnamurthi, V.S. Chauhan, Defatted algal biomass as a non-conventional low-cost adsorbent: Surface characterization and methylene blue adsorption characteristics, *Bioresource Technol.* 184 (2015) 395–404.
- [27] B. Mella, M.J. Puchana-Rosero, D.E.S. Costa, M. Gutteres, Utilization of tannery solid waste as an alternative biosorbent for acid dyes in wastewater treatment, *J. Mol. Liq.* 242 (2017) 137–145.

- [28] S. Rangabhashiyam, E. Nakkeeran, N. Anu, N. Selvaraju, Biosorption potential of a novel powder, prepared from *Ficus auriculata* leaves, for sequestration of hexavalent chromium from aqueous solutions, *Res. Chem. Intermed.* 41 (2015) 8405–8424.
- [29] S. Rangabhashiyam, N. Selvaraju, Adsorptive remediation of hexavalent chromium from synthetic wastewater by a natural and ZnCl₂ activated *Sterculia guttata* shell. *J. Mol. Liq.* 207 (2015) 39–49.
- [30] G.L. Dotto, E.C. Lima, L.A.A. Pinto, Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: equilibrium isotherm and thermodynamic analysis, *Bioresource Technol.* 103 (2012) 123–130.
- [31] F.V. Hackbarth, F. Girardi, S.M.A.G.U. de Souza, A.A.U. de Souza, R.A.R. Boaventura, V.J.P. Vilar, Marine macroalgae *Pelvetia canaliculata* (Phaeophyceae) as a natural cation exchanger for cadmium and lead ions separation in aqueous solutions, *Chem. Eng. J.* 242 (2014) 294–305.
- [32] S. Rangabhashiyam, N. Selvaraju, B. Raj Mohan, P.K. Muhammed Anzil, K.D. Amith, E.R. Ushakumary, Hydrous Cerium Oxide Nanoparticles Impregnated Enteromorpha sp. for the Removal of Hexavalent Chromium from Aqueous Solutions. *J. Environ. Eng.* 142, (2016).
- [33] G.L. Dotto, V.M. Esquerdo, M.L.G. Vieira, L.A.A. Pinto, Optimization, kinetic analysis of food dyes biosorption by *Spirulina platensis*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 91 (2012) 234–241.
- [34] M.H. Zamora, E.C. Urbina, F.M. Jerónimo, H.V.P. Vela, T.P. Noyola, M.C.M. Horcasitas, R.O.C. Villanueva, Bioremoval of the azo dye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*, *Environ Sci Pollut Res.* 22 (2015) 10811–10823.
- [35] V.V. Pathak, R. Kothari, A.K. Chopra, D.P. Singh, Experimental and kinetic studies for phycoremediation and dye removal by *Chlorella pyrenoidosa* from textile wastewater, *J. Environ Manag.* 63 (2015) 270–277.
- [36] A.G. Püntener, Nontextile dyeing (leather dyes). In: Hunger, K. (Ed.), *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. Wiley, Freiburg, pp. 427–541 (Chapter 5.1). 2002.
- [37] R.J. Hunter, *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. Academic Press, London; New York, 1981.
- [38] X. Han, Y.S. Wong, M.H. Wong, N.F.Y. Tam, Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*, *J. Hazard. Mater.* 146 (2007) 65–72.
- [39] P.X. Sheng, Y.P. Ting, J.P. Chen, L. Hong, Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 131–141.
- [40] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603–619.

- [41] R.K. Maurya, T. Ghosh, C. Paliwal, A.C.K. Shrivastava, I. Pancha, A. Ghosh, S. Mishra, Biosorption of methylene blue by de-oiled algal biomass: equilibrium, kinetics and artificial neural network modelling, *PLoS one*.10 (2014) 1-13.
- [42] N.F. Cardoso, E.C. Lima, I.S. Pinto, C.V. Amavisca, B. Royer, R.B. Pinto, W.S. Alencar, S.F.P. Pereira, Application of cupuassu shell as biosorbent for the removal of textile dyes from aqueous solution, *J. Environ. Manage.* 92 (2011) 1237–1247.
- [43] E.C. Lima, M.A. Adebayo, F.M. Machado, Kinetic and equilibrium models of adsorption. In: Bergmann CP, Machado FM (eds) *Carbon nanomaterials as adsorbents for environmental and biological applications*. Springer, p 33–69, 2015.
- [44] E.C. Lima, B. Royer, J.C.P. Vaghetti, N.M. Simon, B.M. da Cunha, F.A. Pavan, E.V. Benvenuti, R.C. Veses, C. Airoidi, Application of Brazilian-pine fruit coat as a biosorbent to removal of reactive red 194 textile dye from aqueous solution. Kinetics and equilibrium study, *J. Hazard. Mater.* 155 (2008) 536–550.
- [45] P. Waranusantigul, P. Pokethitiyook, M. Kruatrachue, E.S. Upatham, Kinetics of basic dye (methylene blue) biosorption by giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*), *Environ. Pollut.* 125 (2003) 385–392.
- [46] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361–1403.
- [47] H. Freundlich, Adsorption in solution, *Phys. Chem. Soc.* 40 (1906) 1361–1368.
- [48] L.G. da Silva, R. Ruggiero, P.M. Gontijo, R.B. Pinto, B. Royer, E.C. Lima, T.H.M. Fernandes, T. Calvete, Adsorption of Brilliant Red 2BE dye from water solutions by a chemically modified sugarcane bagasse lignin, *Chem. Eng. J.* 168 (2011) 620–628.
- [49] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 2–10.
- [50] J.S. Piccin, T.R.S. Cadaval JR, A.A. Pinto, G.L. Dotto, Adsorption isotherms in liquid phase: experimental, modeling, and interpretations, in: Adrián Bonilla-Petriciolet, Didilia Ileana Mendoza-Castillo, Hilda Elizabeth Reynel-Avila (Eds.), (Org.). *Adsorption Processes for Water Treatment and Purification*, 1ed., v. 1, 2017.
- [51] M.H.T. Pinheiro, V.P. Lemos, K.G.F. Dantas, Especificação e Quimissorção de Pb(II) em rejeito de caulim, *Quim. Nova* 36 (2013) 272–278.
- [52] D.D. Asouhidou, K.S. Triantafyllidis, N.K. Lazaridis, K.A. Matis, S.S. Kim, T.J. Pinnavaia, Sorption of reactive dyes from aqueous solutions by ordered hexagonal and disordered mesoporous carbons, *Microporous Mesoporous Mater.* 117 (2009) 257–267.

Capítulo 8

Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões oriundas deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

8.1 Conclusões

A partir dos estudos realizados pode-se concluir que:

- As microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. são capazes de assimilar nutrientes presentes no efluente de curtume tais como nitrogênio, fosforo e carbono, para a produção de biomassa com diversas aplicações, entre elas a produção de biodiesel.
- O estudo do delineamento composto central rotacional (DCC) demonstrou que a concentração de efluente e a intensidade luminosa tem efeito significativo na quantidade de biomassa produzida, bem como na remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo.
- Verificou-se ainda no estudo do DCC que as condições que maximizam a concentração de biomassa, remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo foram as condições de cultivo com maior concentração de efluente de curtume e máxima intensidade luminosa, indicando assim a não necessidade da diluição do efluente.

- Verificou-se máximas concentrações de biomassa de $1,75 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ para a *Scenedesmus* sp. e $1,64 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ para a *Chlorella* sp. para os cultivos em fotobiorreatores Airlift sem diluição de efluente .
- O cultivo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. em efluente de curtume promoveu elevada redução de todos os parâmetros físico-químicos analisados NT ($91,68 \pm 0,70\%$ - $88,10 \pm 3,53\%$), $\text{NH}_3\text{-N}$ ($94,36 \pm 0,28\%$ - $90,68 \pm 2,78\%$), $\text{PO}_4\text{-P}$ ($97,33 \pm 1,35\%$ - $98,10 \pm 0,51\%$), CI ($93,56 \pm 0,56\%$ - $89,46 \pm 2,45\%$) e DQO ($66,64 \pm 3,34\%$ - $71,21 \pm 2,24\%$) evidenciando a eficiências desta técnica na depuração do efluente.
- A composição da biomassa microalgal foi significativamente relacionadas com a condição de cultivo, a cultura com menor concentração de nutrientes ocasionou o acúmulo de maiores teores de lipídios ($27,14 \pm 0,65\%$, Sc - $25,46 \pm 1,61\%$, Chl) e carboidratos ($34,17 \pm 0,19\%$, Sc - $34,80 \pm 1,56\%$, Chl) que podem ser utilizados na síntese de biodiesel e etanol, respectivamente.
- A composição dos ácidos graxos obtidos a partir da transesterificação dos lipídios da microalga *Scenedesmus* sp., cultivada em diferentes concentrações de efluente, apresentaram elevados teores de ácidos graxos insaturados ($52,24\%$ - $57,76\%$). Já os biodieseis produzidos através dos lipídios da microalga *Chlorella* sp. apresentaram estabilidade oxidativa devido à presença de elevados teores de ácidos graxos saturados ($51,24\%$ - $69,35\%$). Além disso, nestes biodieseis foram verificados teores de ácido linolênico inferiores a 12% ($4,49\%$, Sc - $7,38\%$, Chl), bem como a ausência de ácidos graxos poliinsaturados com quatro ou mais ligações duplas, estando de acordo com a norma EN 14214.
- No processo de coagulação/floculação das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em efluente de curtume, o agente floculante a base de taninovegetal, Tanfloc SH, apresentou uma recuperação satisfatória da biomassa de aproximadamente 98% para ambas microalgas nas condições de dosagem de coagulante/floculante 450 mg de floculante/g de biomassa (Sc) e 200 mg de floculante/g de biomassa (Chl), velocidade de agitação de 20 rpm , tempo de mistura de 2 min e tempo de sedimentação de 5 min .
- O uso do coagulante/floculante Tanfloc SH acarretou na redução do teor de

lipídios nas microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp., entretanto não foram observadas alterações nos teores de ácidos graxos do FAEE - *Fatty acid ethyl esters*.

- A utilização da biomassa residual da microalga *Scenedesmus* sp. – DMB (após extração dos lipídios) mostrou ser um material promissor para adsorção do corante Acid Blue 161. Nos ensaios em soluções aquosas foram verificadas elevadas quantidades de corante adsorvidas ($83,2 \text{ mg.g}^{-1}$). Além disso, quando se utilizou o biossorvente no efluente de curtume real foram verificadas remoções significativas do corante AB-161 (76,65%), carbono orgânico total (50,78%) e nitrogênio total (19,80%).
- A caracterização do biossorvente por Espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR - *Fourier-transform infrared spectroscopy*), permitiu identificar quais grupos funcionais presentes na superfície da biomassa interagiram com o corante e promoveram a remoção do mesmo. A partir das imagens geradas por microscopia eletrônica de varredura (SEM - *Scanning Electron Microscope*) foi possível verificar a presença de rugosidades e cavidades irregulares na superfície do biossorvente, as quais desempenharam um papel importante na biossorção do corante. A avaliação da área superficial e da porosidade analisadas pelos métodos BET (Brunauer, Emmett and Teller) e BJH (Barret, Joyner, and Halenda), respectivamente, evidenciaram uma área superficial de $3,47 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, um volume total de poros de $8,02 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e a presença de mesoporos com diâmetro médio de $66,3 \text{ \AA}$. Na caracterização por potencial zeta foi possível identificar a melhor faixa de pH utilizada para a remoção do corante, de acordo com a carga superficial do biossorvente.
- Na avaliação do mecanismo cinético que controla o processo de adsorção, observou-se o melhor ajuste dos dados para com o modelo cinético de ordem geral. O modelo da isotermia de Freundlich mostrou o melhor ajuste dos dados de equilíbrio em ambas temperaturas experimentais (25 e 40 °C). A determinação dos parâmetros termodinâmicos indicou que a adsorção do corante AB-161 pelo biossorvente DMB é um processo endotérmico e espontâneo com uma reação física por interação eletrostática.

8.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Os resultados obtidos na realização deste trabalho permitem a sugestão de realização de trabalhos futuros, conforme segue:

- Cultivar as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. em efluentes das diferentes etapas de processamento do couro, caracterizando os efluentes ao longo do processo de tratamento a fim de verificar a remoção dos nutrientes nitrogênio, fósforo, carbono orgânico total e carbono inorgânico;
- Avaliar o crescimento das microalgas *Tetrasselmis* sp., *Spirulina* sp., consórcio de microalgas, e outras cepas em efluente de curtume, e outros eventuais efluentes;
- Cultivar as microalgas em diferentes diluições de efluente, utilizando efluente de outras etapas com menores concentrações de nutrientes para a diluição;
- Imobilizar as microalgas em diferentes substratos, tais como ágar, alginato, colágeno e casca de arroz para a aplicação no tratamento de efluentes de curtume;
- Projetar o tratamento com microalgas em escala industrial e implementar em associação com as operações unitárias de uma estação de tratamento de efluente – ETE;
- Utilizar a biomassa de microalgas como substrato para a produção de biogás (por digestão anaeróbia) e etanol (por fermentação);
- Utilizar a biomassa residual (após extração dos lipídios) na biossorção de corantes e outros contaminantes da indústria coureira;
- Cultivar as diferentes espécies de microalgas na presença de substâncias utilizadas no processamento do couro conhecidas como compostos disruptores endócrinos verificando a remoção destes.

Referências bibliográficas

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.A.; IBRAHEEM, I. B. M.; SAUDI. Microalgae and wastewater treatment. *Journal of Biological Sciences*, v. 19, p. 57–275, 2012.

ABQTIC. Guia brasileiro do couro. Chemists, Association of Leather Technicians and Chemist, 2017.

AGIRMAN, N.; CETIN, A.K. Effects of nitrogen starvations on cell growth, protein and lipid amount of *Chlorella vulgaris*. *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 24(11), p. 3643-3648, 2015.

AGUSTINI, C.B Isolamento microbiano na biodegradação de resíduos de curtumes. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

AHMAD, A. L.; MAT YASIN, N. H.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 584-593, 2011.

ALONSO, D.L.; BELARBI, E.H.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; RODRÍGUEZ-RUIZ, J.; GRIMA, E.M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, v. 54(5), p. 461-471, 2000.

ANDERSEN, R.A. *Algal Culturing Techniques*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

ANDRIOLI, E. Depilação enzimática-oxidativa de peles para curtimento. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

ANDRILEVICIUTE, V.; MAKAREVICIENE, V.; SKORUPSKAITE, V.; GUMBYTE, M. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloopsis* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. *Journal Applied Phycology*, v. 26, p. 83-90, 2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2017). Disponível em www.anp.gov.br. Acesso em novembro de 2017.

ANTHONY, R.J.; ELLIS, J.T.; SATHISH, A.; RAHMAN, A.; MILLER, C.D.; SIMS, R.C.. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 149, p.65–70. 2013b.

APAYDIN, O.; KURT, U.; GÖNÜLLÜ, M.T. An investigation on the treatment of tannery wastewater by electrocoagulation. *Global Nest Journal*, v. 11(4), p. 546–555, 2009.

AQUIM, P. M. Balanço de Massa: uma ferramenta para otimizar os processos de ribeira e Curtimento. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS, 159p., Porto Alegre, 2004.

AQUIM, P. M. Gestão em Curtumes: uso integrado e eficiente da água. (Tese). PPGEQ, UFRGS, Porto Alegre. 159p, 2009

ASLAN, S.; KAPDAN, I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering*, v. 28, p. 64–70, 2006.

ATABANI, A.E.; SILITONGA, A.S.; BADRUDDIN, I.A.; MAHLIA, T.M.I.; MASJUKI, H.H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 2070– 2093, 2012.

BAIEE, M.A.; SALMAN, J.M. Effect of phosphorus concentration and light intensity on protein content of microalga *Chlorella vulgaris*. *Mesopotamia Environmental Journal*, v. 2, p. 75-86, 2016,

BAKUEI, N.; AMINI, G.; NAJAFPOUR, G.D.; JAHANSHAHI, M.; MOHAMMADI, M. Optimal cultivation of *Scenedesmus* sp. microalgae in a bubble column photobioreactor. *Indian Journal of Chemical Technology*, v. 22, p. 20-25, 2015.

BARRA, L.; CHANDRASEKARAN, R.; BRUNET, F.C.C. The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. *Marine Drugs*, v. 12, p. 1641-1675, 2014.

BARRUT, B. Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting. *Bioresource Technology*, v.128, p. 235-240, 2013.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae anatomy biochemistry and biotechnology, London UK:Taylor & Francis Group. 2006.

BAUMGARTNER, T.R.S.; BURAK, J.A.M.; KOGIKOSKI, M.E.; SEBASTIEN, Y.N.; ARROYO, P.A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Biociências*. v. 11, n. 2, p. 250-255, 2013.

BAUR, L. Estudo e Identificação de Nitrogênio de Efluentes de Curtume. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

- BECKER, E. W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. New York: Cambridge University Press. 293, 1994.
- BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, p. 207–210 2007.
- BEHRENS, P.W. Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier/Academic Press, 2005.
- BELTRÁN-HEREDIA, J. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimization studies. *Chemical Engineering Journal*, v. 162, p. 1019-1025, 2010.
- BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J. Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agente. *Desalination*, v. 249, p. 353-358, 2009.
- BENAVENTE-VALDÉSA, J.R.; AGUILARA, C.; CONTRERAS-ESQUIVELA, J.C.; MÉNDEZ-ZAVALAB, A.; MONTAÑEZB, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 117–125, 2016.
- BEUCKELS, A., SMOLDER, E., MUYLAERT, K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water research*, v. 77, p. 98–106, 2015.
- BLIGH, E.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research*, v. 41, p. 2301–2324, 2007.
- BOROWITZKA, M.A. Carotenoid production using microorganisms. In: Cohen, Z. & Ratledge, C. (eds.) *Single Cell Oils*. AOCS Press, Champaign, Illinois. p. 124-137, 2005.
- BOROWITZKA, M.A., High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 743–756, 2013.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. *Biotechnologia Industrial. Fundamentos*, 1ª edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001;
- BRENNAN, L. & OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557–77, 2010.
- BREUER, G.A.; LAMERS, P.P.A.; MARTENS, D.E.A.; DRAAISMA, R.B.B.; WIJFFELS, R.H. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 1–9, 2013.

BUCY, H.B.; BAUMGARDNER, M.E.; ANTHONY, J.M. Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl eicosapentaenoate and methyl docosahexaenoate. *Algal Research*, v. 1, p. 57-69, 2012.

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

CARDOSO, A.S.; VIEIRA, G.E.G., MARQUES, A.K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. *Brazilian Journal of Biosciences*, v. 9, n. 4, p. 542-549, out./dez., 2011.

CARDOSO, N.F.; LIMA, E.C.; ROYER, B.; BACH, M.V.; DOTTO, G.L.; PINTO, L. A. A.; CALVETE, T. Comparison of *Spirulina platensis* microalgae and commercial activated carbon as adsorbents for the removal of Reactive Red 120 dye from aqueous effluents. *Journal of Hazardous Materials*, v. 241–242, p. 146–153, 2012.

CAREY, R.O. Evaluating nutrient impacts in urban watersheds: Challenges and research opportunities. *Environmental Pollution*, v. 173, p. 138-149, 2013.

CASSANO, R.; MOLINARI, M.; ROMANO; DRIOLI, E. Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane processes: A review. *Journal of Membrane Science*, v.181 (1), p.111-126, 2001.

CEN – (European Committee for Standardization). Automotive fuels — Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines — Requirements and test methods. 2009.

CHANDRA, T.S.; MUDLIAR, S. N.; VIDYASHANKAR, S.; MUKHERJI, S.; SARADA, R.; KRISHNAMURTHI, K.; CHAUHAN, V.S. Defatted algal biomass as a non-conventional low-cost adsorbent: Surface characterization and methylene blue adsorption characteristics. *Bioresource Technology*, v. 184, p. 395–404, 2015.

CHEKROUN, K.B.; SÁNCHEZ, E.; BAGHOUR, M. The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 1, p. 19-32, 2014.

CHEN, C.Y.; YEH, K.L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, v. 102, p.71–81, 2011.

CHEVALIER, P.; DE LA NÖUE, J. Efficiency of immobilized hiperconcentrated algae for ammonium and ortho-phosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters*, v. 7, p. 395-400, 1985.

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

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

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 686-702, 2011.

CICB. Centro das indústrias de curtume do Brasil. www.cicb.org.br.

COCA, M.; BARROCAL, V.M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M.T. Protein production in spirulina platensis biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioproducts Processing*, p. 1-7, 2014.

COUTO, R.M.; SIMÕES, P.C.; REIS, A.; SILVA, T.L.; MARTINS, V.H.; SÁNCHEZVICENTE, Y. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Engineering in Life Sciences*, v. 10, p. 158–164, 2010.

CRAIGIE, J. Cell walls. In: Cole K, Sheath R (eds) *Biology of the red algae*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 221–257, 1990.

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

DANESHVAR, E.; KOUSHA, M.; SOHRABI, M. S.; KHATAEE, A.; CONVERTI, A. Biosorption of three acid dyes by the brown macroalga *Stoechospermum marginatum*: isotherm, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 19:5–196. p. 97–306, 2012.

DANQUAH, M.K.; ANG, L.; UDUMAN, N.; MOHEIMANI, N.; FORDE, G.M. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: Exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 84, p.1078–1083, 2009.

DASGUPTA, C.N.; GILBERT, J.J.; LINDBLAD, P.; HEIDORN, T.; BORGVANG, S.A.; SKJANES, K.; DAS, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10218-10238, 2010.

DE GODOS, I.; GUZMAN, H. O.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; BECARES, E.; MUÑOZ, R.; VARGAS, V.A. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 102 p. 923–927, 2011.

DE JESUS, G.L. Avaliação do Processo Combinado de Coagulação e Osmose Direta para a Concentração de Biomassa Algal, dissertação de mestrado, Porto Alegre, p. 153, 2014.

DEEPALI, K.K.; GANGWAR, R.; JOSHI, B.D. Comparative study of physico-chemical properties of effluent from tannery industries. *Indian Journal of Environmental Sciences*, v. 3, p.49–52, 2009.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, v. 49, p. 2106–2116, 2008.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 2006.

DETTMER, A. Seleção, isolamento, caracterização e otimização dos meios de cultivo para obtenção de enzimas aplicadas ao processamento de peles na etapa de depilação-calceiro. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

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

DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, A.; GANGULY, A.; GUPTA, S.; BASU, S. Application of response surface methodology for preparation of low-cost adsorbent from citrus fruit peel and for removal of Methylene Blue. *Desalination*, v. 275, p. 1–3, 2011.

ESHAQ, F.S.; ALI, M.N.; MOHD, M.K. Spirogyra biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) production. *International Journal of Engineering Science and Technology*, v. 2(12), p. 7045–7054, 2010.

FAROOQ, W.; LEE, Y.C.; RYU, B.G.; KIM, B.H.; KIMHS; CHOI, Y.E, *et al.* Two-stage cultivation of two *Chlorella sp.* Strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, v. 132, p. 230–238, 2013.

FENG, J. W.; SUN, Y.B.; ZHENG, Z.; ZHANG, J.B.; LI, S.; TIAN, Y.C. Treatment of tannery wastewater by electrocoagulation. *Journal of Environmental Sciences*, v.19(12),

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

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABINO, A. Estabilidade oxidativa dos ésteres de ácido graxo do biodiesel de óleo de soja. *Ciência Agrícola*, v. 62, p. 291- 295, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY G.H.S.; A simple method for isolation and purification of total lipids. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226(1), p. 497, 1957.

FONTOURA, J. Desempenho de microbicidas para preservação de peles e couros. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

FORTIER, M.; STURM, B. Geographic analysis of the feasibility of collocating algal biomass production with wastewater treatment plants, *Environmental Science and Technology*, v. 46, p. 11426–11434, 2012.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova*, v.36, n.3, p.437-448; 2013.

FUCK, W. Tingimento de couro com corantes fúngicos. Tese de Doutorado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

GALADIMA, A.; MURAZA, O. Biodiesel production from algae by using heterogeneous catalysts: A critical review. *Energy*, v. 78, p.72-83, 2014.

GANESH, R.; BALAJI, G.; RAMANUJAM, R. A. Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactorrespirometric assessment. *Bioresource Technology*, v. 97(15), p. 1815–1821, 2006.

GARCIA, J.; MUJERIEGO, R.; HERNANDEZ-MARINE, M. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 331–339, 2000.

GIRARD, J.-M.; ROY, M.-L.; HAFSA, M. B.; GAGNON, J.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M.; TREMBLAY, R.; DESCHÊNES, J.-S. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, Oxford, v. 5, n. 7, p. 241-248, 2014.

GOMES, C.; PICCIN, J.S.; GUTTERES, M. Optimizing adsorption parameters in tannery-dye-containing effluent treatment with leather shaving waste, *Journal Process Safety and Environmental Protection*, v. 99, p. 98–106, 2016.

GOMES, C.S Adsorção aplicada ao tratamento de efluentes de tingimento de couro. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

GOUVEIA, L.; GRAÇA, S.; SOUSA, C.; AMBROSANO, L.; RIBEIRO, B.; BOTREL, E.P.; CASTRO, N.P.; FERREIRA, A.F.; SILVA, C.M. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations. *Algal Research*, v. 16, p. 167–176, 2016.

GRAHAM, N. Characterization and coagulation performance of a tannin-based cationic polymer: A preliminary assessment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 327, p. 9-16, 2008.

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

GREENWELL, H.C.; LAURENS, L.M.L.; SHIELDS, R.J.; LOVITT, R.W.; FLYNN, K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 7, p. 703–26. 2010.

GREGORY, J., Flocculation Fundamentals, in: *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 459–491, 2013.

GRIS, L.R.S. Produção de microalga *Nannochloropsis oculada* em fotobiorreatores Airlift. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 148 p. 2011.

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

GUPTA, N.; KUSHWAHA, A.K.; CHATTOPADHYAYA, M.C. Adsorption studies of cationic dyes onto Ashoka (*Saraca asoca*) leaf powder. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 43(4), p. 604–613, 2012.

GUTTERRES, M. A Ciência rumo à Tecnologia do Couro. 1. ed. Porto Alegre. Tríplice Assessoria e Soluções Ambientais, v. 1, 505 p., 2008.

GUTTERRES, M. Analysis of vegetable tannin absorption during the tannage of hide/hide powder. *Journal American Leather Chemists Association*, v. 102(7), p. 216–221, 2007.

GUTTERRES, M.; MATOS, E.A. Emprego de Tanino Vegetal no Tratamento de Águas de Abastecimento e Residuárias. *Saneamento Ambiental*, v. 119, p. 29-33, 2006.

GUTTERRES, M.; BENVENUTI, J.; FONTOURA, J.T.; ORTIZ-MONSALVE, S. Characterization of Raw Wastewater from Tanneries. *Journal Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 99, p. 280-287, 2015.

GUTTERRES, M.; MELLA B. Chapter 16: Chromium in Tannery Wastewater, Book Heavy Metals in Water: Presence, Removal and Safety, Springer Publisher, Londres, 2014.

HAKALIN, N.L.S.; PAZ, A.P.; ARANDA, D. A. G.; MORAES, L. M. P. Enhancement of Cell Growth and Lipid Content of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* sp. by Optimizing Nitrogen, Phosphorus and Vitamin Concentrations for Biodiesel Production. *Natural Science*, v. 6, p.1044-1054, 2014.

HAKALIN, N.L.S. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para produção de biodiesel. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

HAMMED, A. M.; PRAJAPATI, S. K.; SIMSEK, S.; SIMSEK, H. Growth regime and environmental remediation of microalgae. *Algae*, v. 31(3), p. 189-204, 2016.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HATTORI, A.; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by sub-cell preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. *Plant Physiol.* v. 41, p. 1031, 1966.

HAYDAR, S.; AZIZ, J.A. Characterization and treatability studies of tannery wastewater using chemically enhanced primary treatment (CEPT) - a case study of Saddiq Leather Works. *Journal of Hazardous Materials*, v. 163(2–3), p.1076–1083, 2009a.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Free Radical Res.*, v. 25, p. 247-257, 1996.

HIROOKA, T.; AKIYAMA, Y.; TSUJI, N.; NAKAMURA, T.; NAGASE, H.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, p. 200-203, 2003.

HO, S.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 244–252, 2012.

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

HU, Q. Environment effects on cell composition. In: RICHMOND, A., ed. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd., p 83–93, 2004.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*. v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

HUNG, C. C.; WONG, G. T. F.; LIU, K. K.; SHIAH, F. K.; GONG, G. C. The effects of light and nitrate levels on the relationship between nitrate reductase activity and NO₃-uptake: field observations in the East China sea. *Limnology and Oceanography*, v. 45, p. 836-848, 2000.

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

JIA, Q.; XIANG, W.; YANG, F.; HU, Q.; TANG, M.; CHEN, C.; WANG, G.; DAIL, S.; WU, H.; WU, H. Low-cost cultivation of *Scenedesmus* sp. with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. *Journal Applied Phycology*, v. 28, p. 727–736, 2016.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 186-193, 2011.

JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E.A.; EMBIRUCU, M.; GHIRARDI, M. L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1406-1413, 2010.

KAMYAB, H.; MD DIN, M. F.; PONRAJ, M.; KEYVANFAR, A., REZANIA, S.; TAIB, S.M. Isolation and screening of microalgae from agro-industrial wastewater (POME) for biomass and biodiesel sources. *Desalination and Water Treatment*, v. 57, 2016.

- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environment International is an international*, v. 35, p. 127–41, 2009.
- KHAN, S.A.; HUSSAIN, M.Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, Vol.13, No.9, pp. 2361-2372, 2009.
- KIM, J.; YOO, G.; LEE, H.; LIM, J.; KIM, K.; KIM, C.W.; Park, M.S. Yang JW. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 862-876, 2013.
- KING, L.M.; LIANG, X.; RUSCH, K.A. Nutritional properties of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* fed the freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 33, n. 4, p. 478-488, 2002.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v. 86(10), p. 1059-1070, 2005.
- KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Processing Technology*, v. 88, p. 669–677, 2007.
- KOH, M.Y.; GHAZI, T.I.M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 2240–2251, 2011.
- KOUSHA, M.; DANESHVAR, E.; DOPEIKAR, H.; TAGHAVI, D.; BHATNAGAR A. Box–Behnken design optimization of Acid Black 1 dye biosorption by different brown macroalgae. *Chemical Engineering Journal*, v. 179, p. 158–68, 2012.
- KOUSHA, M.; DANESHVAR, E.; SOHRABI, M. S.; JOKAR, M.; BHATNAGAR, A. Adsorption of acid orange II dye by raw and chemically modified brown macroalga *Stoechospermum marginatum*. *Chemical Engineering Journal*, v. 192, p. 67–76, 2012.
- KOUSHA, M.; FARHADIAN, O.; DORAFSHAN S.; SOOFIANI, N. M.; BHATNAGAR, A. Optimization of malachite green biosorption by green microalgae - *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*: Application of response surface methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, p. 291–294, 2013.
- KRZEMIŃSK, I. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella* protothecoides under different light intensities. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 72-77, 2015.
- KUMAR, M.S.; MIAO, Z.H.; WYATT, S.K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. *Bioresource Technology*, v. 101 p. 6012–6018, 2010.
- KURT, U.; APAYDIN, O.; GONULLU, M. T. Reduction of COD in wastewater from an organized tannery industrial region by electro-Fenton process. *Journal of Hazardous Materials*, v.143(1–2), p. 33–40, 2007.

- LAM, G.P.; VERMUË, M.; OLIVIERI, G.; VAN DEN BROEK, L.A.M.; BARBOSA, M.J.; EPPINK, M.H.M.; WIJFFELS, R.H.; KLEINEGRIS, D.M.M. Cationic polymers for successful flocculation of marine microalgae. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 804–807, 2014.
- LAM, M. K.; LEE, K.T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 673-690. 2012.
- LARA, R.S.G. Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator *Airlift*. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.
- LAURENS, L.M.; VAN WYCHEN, S.; MCALLISTER, J.P.; ARROWSMITH, S.; DEMPSTER, T.A.; MCGOWEN, J.; PIENKOS, P.T. Strain, biochemistry, and cultivation-dependent measurement variability of algal biomass composition. *Analytical Biochemistry*, v. 452, p. 86 – 95, 2014.
- LEE, R.E (Ed). Phycology. 4th ed. *Cambridge University Press*. Colorado State University, USA, 2008.
- LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal Applied Phycology*, v. 13, p. 307-315, 2001.
- LETA, S.; ASSEFA, F.; GUMAELIUS, L.; DALHAMMAR, G. Biological nitrogen and organic matter removal from tannery wastewater in pilot plant operations in Ethiopia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66(3), p.333–339, 2004.
- LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, v. 66, n. 1, p. 204-213, 2014.
- LI, Y.; CHEN, Y.F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater in nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, v.102, p. 5138–5144, 2011a.
- LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, 629-636, 2008.
- LI, Y.; ZHOU, W.; BING, H., MIN, M.; CHEN, P.; RUAN, R.R.. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource Technology*, v.102, p. 10861–10867, 2011b.
- LIANG, Y. Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. *Applied Energy*, v. 104, p. 860–868, 2013.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. BIOMASS and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Letters*, v. 31, p. 1043–1049, 2009.

- LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 106–110, 2011.
- LIU, J.; YUAN, C.; HU, G.; LI, F. Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 Under Nitrogen Limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 166, p. 2127–2137, 2012.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, v. 32, p. 1596-1608, 2009.
- LOFRANO, G.; MERIÇ, S.; ZENGİN, G.E.; ORHON, D. Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: A review. *Science of the Total Environment*, v.(461-462), p. 265-281, 2013.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 588 p.
- LUQUE, R.; LOVETT, J.C.; DATTA, B.; CLANCY, J.; CAMPELO, J.M.; ROMERO, A.A. Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. *Energy Environmental Science*, v. 3, p. 1706–1721, 2010.
- MA, X.C.; ZHENG, H.; ADDY, M.; ANDERSON, E.; LIU, Y.; CHEN, P.; RUAN, R. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in wastewater with waste glycerol: Strategies for improving nutrients removal and enhancing lipid production. *Bioresource technology*, v. 207, p. 252-261, 2016.
- MACHADO, F.M.; SOPHIA, A.C.; LIMA, E.C.; DIAS, S.L.P.; PROLA, L.D.T.; SAUCIER, C.; JAURIS, I.M.; ZANELLA, I.; FAGAN, S.B. Adsorption of Alizarin Red S dye by carbon nanotubes - an experimental and theoretical investigation. *Journal of Physical Chemistry*, v. 120, p. 18296–18306, 2016.
- MAGRO, F.G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L.M. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 37(1), p. 159-174, 2016.
- MAIRET, F.; BERNARD, O.; MASCI, P.; LACOUR, T.; SCIANDRA, A. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff.galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 142-149, 2011.
- MAKULLA, A. Fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus*: correlation to dilution rates. *Limnology*, v. 30, p. 162-168, 2000.
- MALCATA, F.X. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, v. 29, p. 542–549, 2011.
- MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiol Biotechnology*, v. 84, p. 281-91, 2009.

MANDAL, T.; DASGUPTA, D.; MANDAL, S.; *et al.* Treatment of leather industry wastewater by aerobic biological and Fenton oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*, v.180(1-3), 204-11, 2010.

MARGARITES, A.C.F. Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 2014.

MARGARITES, A.C.F.; COSTA, J.A.V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. *Journal of Engineering Research and Applications* v. 4(11), p.80-86, 2014.

MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v.73, p.263-272, 2000.

MARTINEZ-GUERRA, E.; GUDE, V.G.; MONDALA, A.; HOLMES, W. HERNANDEZ, R. Microwave and ultrasound enhanced extractive-transesterification of algal lipids. *Applied Energy*, v.129, p.354-363, 2014.

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

MATA, T.M.; MELO, A.C.; SIMÕES, M.; CAETANO, N.S. Parametric Study of a Brewery Effluent Treatment by Microalgae *Scenedesmus obliquus*, *Bioresource Technology*, v.107, p.151-158, 2012b.

MELLA, B. Avaliação quali-quantitativa das operações unitárias envolvidas nas estações de tratamento de efluentes em curtumes do estado do Rio Grande do Sul. In: XVIII CONGRESSO DA FEDERAÇÃO LATINO AMERICANA DOS QUÍMICOS E TÉCNICOS DA INDÚSTRIA DO COURO, Montevideo, 2012.

MELLA, B. Remoção de cromo de banhos residuais de curtimento através de precipitação química e eletrocoagulação Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

MELLA, B. Resíduo sólido de depilação-caleiro como adsorvente de corantes para tingimento de couro. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

MELLA, B.; PUCHANA-ROSETO, M.J., COSTA, D.E.S.; GUTTERRES, M. Utilization of tannery solid waste as an alternative biosorbent for acid dyes in wastewater treatment, *Journal of Molecular Liquids*, v. 242, p. 137–145, 2017.

MIRANDA, J.R.; PASSARINHO, P.C.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96, p. 555–564, 2012.

MOHEIMANI, N. R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *Journal Applied Phycology*, v. 25, p. 387–398, 2013.

MOLINA GRIMA, E.; ACIEN FERNANDEZ, F.G.; GARCIA, F.; CAMACHO R.F.; CHISTI, Y. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 355- 368, 2000.

MOLINA GRIMA, E.; ACIEN FERNANDEZ, F.G.; GARCIA, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 231-247, 1999.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E.H.; FERNÁNDEZ, F.A.; MEDINA, A.R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, v.20, p. 491–515, 2003.

MUNZ, G.; GORI, R.; CAMMILLI, L. Characterization of tannery wastewater and biomass in a membrane bioreactor using respirometric analysis. *Bioresource Technology*, v. 99(18), p.8612- 8618, 2008.

MURAT, S.; GENÇELI, E.A.; TASLI, R.; ARTAN, N.; ORHON, D. Sequencing batch reactor treatment of tannery wastewater for carbon and nitrogen removal. *Water Science and Technology*, v. 46 (9), p. 219–227, 2002.

NOGUEIRA, N.S. Análise Delphi e SWOT das matérias-primas de produção de Biodiesel: soja, mamona e microalga. Dissertação de mestrado, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

OJAMAE, K. Growth physiology and photosynthetic performance of green microalgae mass culture grown in a thin-layer cascade. [S.l.]: University of Tartu, 2011.

OLIVEIRA, C.; RUBIO, J. Zeta potential of single and polymer-coated microbubbles using an adapted microelectrophoresis technique. *International Journal of Mineral Processing*, v. 98, p.118–123, 2011.

ONG, H.C.; MAHLIA, T.M.I.; MASJUKI, H.H.; NORHASYIAMA, R.S. Comparison of palm oil, *Jatropha curcas* and *Calophyllum inophyllum* for biodiesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 115, p. 3501-3515, 2011.

ORHON, A.; GENÇELI, E. Experimental evaluation of the nitrification kinetics for tannery wastewaters. *Water research*, v. 6(1), p. 43-50, 2000.

ORTIZ-MONSALVE, S. Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

OSWALD, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. *Micro-algal Biotechnology*. 2. ed., Sydney, 477 p., 1988.

OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions of the American Society of Civil Engineer*, v. 122, p. 73-105. 1957.

- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MAURYA, R.; TRIVEDI, K.; PATIDAR, S.K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, v. 189, p. 341–348, 2015.
- PARK, J. B. K., R. J. CRAGGS, AND A. N. SHILTON. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, *Bioresource Technology*, v. 102, p. 35–42, 2011.
- PARK, J. H.; JEONG, J. Y.; HEE, D.; DONG, J. L.; SANG, H. K., Anaerobic digestibility of algal bioethanol residue. *Bioresource Technology*, v. 113, p. 78–82, 2012.
- PARMAR, A.; SINGH N.K.; PANDEY A.; GNANSOUNOU E.; MADAMWAR D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10163–10172, 2011.
- PEREIRA, A. M.S.; MONTEGGIA, L.O. Remoção de algas de efluentes de lagoas de estabilização por processo físico-químico com coagulantes naturais. 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Joinville, SC 2003.
- PÉREZ, H.E.B. Biodiesel de Microalgas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1-19, 2007.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, FME.; DE-BASHAN, LE.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products *Water Research*, v. 45, p. 11–36. 2011.
- PICCIN, J. S. Resíduo sólido da indústria coureira como adsorvente alternativo de corantes. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS, 175p., Porto Alegre, 2013.
- PICCIN, J.S.; GOMES, C.S.; MELLA, B.; GUTTERRES, M. Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 4, p. 1061–1067, 2016.
- PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P. e ANDRADE, J.B. Biodiesel: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.
- PIRES, J.C.M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 3043 – 3053, 2012.
- PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 17–25, 2011.
- PROULX, D.; DE LA NÖUE, J. Removal of macronutrients from wastewater by immobilized algae. *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and*

Applications. (Moo-Young, M., Ed.). *Elsevier Applied Science*, London, p. 301-310. 1988.

PUCHANA-ROSETO, M.J.; LIMA, E.C.; ORTIZ-MONSALVE, S.; MELLA, B.; DA COSTA, D.; POLL, E., GUTTERRES, M. Fungal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye in aqueous solution, *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 4200-4209, 2016.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 287-293, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65(6), p. 635–48, 2004.

QU, C.B.; WU, Z.F.; SHI, X.M. Phosphate assimilation by *Chlorella* and adjustment of phosphate concentration in basal medium for its cultivation, *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 1735–1740, 2008.

QUEIROZ, M.I.; HORNES, M.O.; DA SILVA-MANETTI, A.G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy*, v. 88, p. 3438-3443, 2011.

RAJAMANI, S.; STREIT, K.; CASE, Y.P. Environmental update on world leather sector from International Union of Environment (iue) Commission of IULTCS. In: XVIII Congresso Latino-Americano dos Químicos e Técnicos da Indústria do Couro, 2008, Rio de Janeiro. Anais do Congresso da FLAQTIC, 2008.

RAMANAN, R.; KIM, B.H.; CHO, D.H.; KO, S.R.; OH, H.M.; KIM, H.S. Lipid droplet synthesis is limited by acetate availability in starchless mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, v. 587, p. 370–377, 2013.

RAMIREZ, N.N.V. Estudo do crescimento da microalga *scenedesmus* sp. em vinhaça. Dissertação de Mestrado (Eng. Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

RAMOS, L.P.; KUČEK, K.; DOMINGOS, A.K.; WILHEM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e socio-ambiental para o Brasil. *Biociência, Ciência e Desenvolvimento*, v. 31, p. 28–37, 2003.

RAPOSO, M.F.J.; DE MORAIS, R.M.; DE MORAIS, A.M. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, v. 93(15), p. 479-486, 2013.

RATHA, S.K.; PRASANNA, R., Bioprospecting microalgae as potential sources of “Green Energy”— challenges and perspectives (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 48, p. 109–125, 2012.

- RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, v. 103, p. 444–467, 2013.
- RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. *Photosynthesis Research*, v. 117, p. 207–219, 2013.
- RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de alimentos. 2° ed. São Paulo: Editora Blucher, 2007.
- RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology*. Oxford: Blackwell Science, p. 566, 2004.
- ROUND, F. E. *The Biology of the Algae* (2nd ed). Edward Arnold (Publishers) Ltd, UK, pp. 1- 23, 1973.
- RUKMINASARI, N. Effect of Temperature and Nutrient Limitation on the Growth and Lipid Content of Three Selected Microalgae (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. and *Scenedesmus* sp.) for Biodiesel Production. *International Journal of Marine Science*, v. 3(17) p. 135-144, 2013.
- SACRISTÁN DE ALVA, M.; LUNA-PABELLO, V. M.; CADENA, E.; ORTÍZ, E. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 146 p. 744–748, 2013.
- SALAMA, A.F.; ABDEL-HAMID, N.M.; EL-SHEEKH, M.; TOSSON, E.; GABR, A.M. *Spirulina Platensis* Microalgae Protects against Diethyl Nitrosamine Carcinogenic Effect on Female Albino Rats. *Alexandria Journal of Veterinary Science*, v. 53(1), p. 167-179, 2017.
- SALLA, A.C.V.; MARGARITES, A.C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L.C.; BRIÃO, V.B.; BERTOLIN, T. E. *et al.* Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*, v. 209, p. 133–141, 2016.
- SÁNCHEZ, E.; OJEDA, K.; EL-HALWAGI, M.; KAFAROV, V. Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: Pichia analysis of heat integration. *Chemical Engineering Journal*, v. 171-177, p. 211-216, 2011.
- SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; BELTRÁN-HEREDIA, J.; SOLERA-HERNÁNDEZ, C. Surface water and wastewater treatment using a new tannin-based coagulant. Pilot plant trials. *Journal of Environmental Management*, v. 91, p. 2051–2058, 2010.
- SANTOS, D.C.; ADEBAYO, M.A.; LIMA, E.C.; PEREIRA, S.F.P.; CATALUÑA, R.; SAUCIER, C.; THUE, P.S.; MACHADO, F.M. Application of carbon composite adsorbents prepared from coffee waste and clay for the removal of reactive dyes from aqueous solutions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, p. 924-938, 2015.

SANTOS, G.M.; MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – alteração da composição da biomassa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 17-21, 2003.

SCHENK, P.M; THOMAS-HALL, S. S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Resource*, v. 1, p. 20–43, 2008.

SEKI, H.; MARUYAMA, H.; SHOJI, Y. Flocculation of diatomite by a soy protein-based bioflocculant. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51(1) , p. 14-18, 2010.

SEMPLE, K. T.; CAIN, R. B.; SCHMIDT, S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 291-300, 1999.

SHEN, Q.H.; JIANG, J.W.; CHEN, L.P.; CHENG, L.H.; XU, X.H.; LIN, H. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresource Technology*, v. 190, p. 257–263, 2015.

SHUQING, L.; JING, L.; JIE, Y.; ZHIHUA, S. Cleaner beam-house process trial on cattle sofa leather. *Journal of Cleaner Production*, v.18, p.471- 477, 2010.

SIDIRAS, D.; BATZIAS, F.; SCHROEDER, E.; RANJAN, R.; TSAPATSI, M. Dye adsorption on autohydrolyzed pine sawdust in batch and fixed-bed systems. *Chemical Engineering Journal*, v. 171(3), p. 883–896, 2011.

SIEBURTH, J.M.; SMETACEK, V.; LENZ, J. Pelagic Ecosystem Structure: Heterotrophic Compartments of the Plankton and Their Relationship to Plankton Size Fractions. *Limnology and Oceanography*, v. 23, p. 1256-1263. 1978.

SILVA, G.F.; CAMARGO, F.L.; FERREIRA, A. L. O. Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. *Fuel Processing Technology*, v. 92, p. 407-413, 2011.

SINGH M.; DAS K.C. Low Cost Nutrients for Algae Cultivation. *Algal Biorefineries*, p.69-82, 2014.

SINGH, A.; OLSEN, S.I.A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. *Applied Energy*, v. 88, p. 3548-3555, 2011.

SINOGAS, C.; ALHO, L.; BRITO, I. Microbiologia: Textos de apoio e Manual Prático. Departamento de Biologia: Universidade de Évora 2003/2004.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 2010;

SOUZA, F.R. Aplicação de enzimas no processamento de couros: Comparação entre processos químicos e coenzimáticos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n.2, p. 87-96, 2006.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemo diversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial applications. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 483–501, 2011.
- STUART, A.S.; DAVEY, M.P.; DENNIS, J.S.; HORST, I.M.; HOWE, C.J.; LEASMITH, D.J.; SMITH, A.G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 277-286. 2011.
- SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 4316– 4342, 2012.
- SUAREZ, P.A.; MENEGHETTI, S.M.P.; MENEGHETTI, M.R. e WOLF, C.R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na óleoquímica. *Química Nova*, v. 30, p. 667-676, 2007.
- SUH, I. S.; LEE, C.G. Photobioreactor Engineering: Design and Performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 8, p. 313-321, 2003.
- SUNDARAPANDIYAN, S.; CHANDRASEKAR, R.; RAMANAIAH, B.; KRISHNAN, S.; SARAVANAN, P. Electrochemical oxidation and reuse of tannery saline wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 180(1–3), p. 197–203, 2010.
- SUKAHARA, K.T.; AWAYAMA, S.S. Liquid Fuel Production Using Microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, v. 48(5), p. 251–259, 2005.
- SZPYRKOWICZ, L.; KAUL, S.N.; NETI, R.N.; SATYANARAYAN, S. Influence of anode material on electrochemical oxidation for the treatment of tannery wastewater. *Water Research*, v. 9(8), p.1601–1613, 2005.
- TAKEDA, H. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, v. 42, p. 673-675, 1996.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S.; SIMPSON, C. G. Removal of Copper and Immobilized Microalga, *Chlorella Vulgaris*. In: Wong, Y. S. e Tam, N.F.Y. Wastewater Treatment with Algae. Springer-Verlag, v. 2, p. 17-36. 1998.
- TANG, H., ABUNASSER, N.; GARCIA, M.E.D.; SIMON M.C. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, p. 3324-3330, 2010.
- TOKUSOGLU, O.; UNAL, M.K. Biomass nutrient profiles of three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, v.68, p.1144-1148, 2003.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, p.3-19, 2004.

- TSENG, R.L.; TSENG, S.K.; WU, F.C. Preparation of high surface area carbons from corncob with KOH etching plus CO₂ gasification for the adsorption of dyes and phenols from water, *Colloids and Surfaces A*. v. 279, p. 69–78, 2006.
- UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M.K.; FORDE, G.M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgals cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, v. 2, n. 1, p. 012701, 2010.
- UGWU, C.U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4021-4028, 2008.
- USDE. Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review. *Biomass Energy Technology Division*. 1984.
- VAN DAM, R.A.; HARFORD, A.J.; LUNN, S.A.; GAGNON, M.M. Identifying the Cause of Toxicity of a Saline Mine Water. *PLoS One*.v. 9(9), p. 106857, 2014.
- VASILEVA, I.; MARINOVA, G.; GIGOVA, L. Effect of nitrogen source on the growth and biochemical composition of a new Bulgarian isolate of *Scenedesmus* sp. *Journal of BioScience and Biotechnology*. p. 125-129, 2015.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnology. *London: Taylor e Francis*. p. 233, 1997.
- VONSHAK, A.; CHEUNG, S.M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology*, v. 36, p. 675-679, 2000.
- WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; SEALOCK, A.; CHEN, Y.; RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *chlorella* sp. *Bioresource Technology*, v.101 (8), p.2623–2628, 2010a.
- WANG, Y. Microalgae as the Third Generation Biofuel: Production, Usage, Challenges and Prospects,” Uppsala University, 2013.
- WANG, Y.; ZENG, Y.; CHAI, X.; LIAO, X.; HE, Q.; SHI, B. Ammonia nitrogen in tannery wastewater: distribution, origin and prevention. *Journal American Leather Chemists Association*, v.107, p. 40-50, 2012.
- WARD, A.; LEWIS, D. Pre-treatment options for halophytic microalgae and associated methane production. *Bioresource Technology*, v. 177, p. 410–413, 2015.
- WEI, A.; ZHANG, X.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q.; YANG, S. T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Berkley, v. 36, n. 11, p. 1383-1389, 2009.
- WIJFFELS, R.H.; BARBOSA, M.J.; EPPINK, M.H.M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 4, p. 287 – 295, 2010.

WILEMAN, A.; OZKAN, A.; BERBEROGLU, H.R. heological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 432–439, 2012.

WOERTZ, I.C.; LUNDQUIST, T.J.; FEFFER, A.S.; NELSON, Y.M. Lipid productivity of algae grown during treatment of dairy and municipal wastewaters. *Journal of Environmental Engineering*, v.135 (11), p. 1115–1122, 2009.

WU, X.; RUAN, R.; DU, Z.; LIU, Y. Current status and prospect of biodiesel production from microalgae. *Energies*, v.5, p. 2667, 2012.

WU, Y.H.; YIN, Y.; HU, H.Y. Microalgal growth with intracellular phosphorus for achieving high biomass growth rate and high lipid/triacylglycerol content simultaneously, *Bioresource Technology*, v. 192, p. 374–381, 2015.

XIN, L.; YING, H. H.; KE, G.; JIA, Y. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, v. 36, p. 379–381, 2010.

XIN, L.; YING, H.H.; KE, G.; XUE, S.Y. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5494–5500, 2010.

XIONG, W.; LI, X.; XIANG, J.; WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 78, p. 29–36, 2008.

XU, H.; MIAO, X. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 126(4), p. 499-507, 2006.

XU, K.; JIANG, H.; JUNEAU, P.; QIU, B. Comparative studies on the photosynthetic responses of three freshwater phytoplankton species to temperature and light regimes, *J. Applied Phycology*, 24, 1113-1122, 2012.

YAN, R. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. *Journal of Applied Phycology*, v. 26, 2011.

YAN, X.; HAN, Y.; LI, Q.; SUN, J.; SU, X. Impact of internal recycle ratio on nitrous oxide generation from anaerobic/anoxic/oxic biological nitrogen removal process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 106, p. 11–18, 2016.

YANG, J.; XU, M.; ZHANG, X.; QIANG, HU.; SOMMERFIELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, v. 102(1), p. 159–165, 2011.

YOO, C.; JUN, S.Y.; LEE, J.Y.; AHN, C.Y.; OH, H.M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 71-74, 2010.

YUAN-KUN, L.; HUI, S. Basic culturing techniques. In RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. England: Blackwell Publishing, p. 40-56, 2004.

YUJIE, F.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, v. 102, p.101–105, 2011.

ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; DANQUAH, M.K.; ZHANG, S.; LU, Y.; SUN, Y.; LIN, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 1385–1392, 2015.

ZHANG, C.; ZHANG, Y.; ZHUANG, B.; ZHOU, X. Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus*-like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 171, p. 71–79, 2014.

ZHANG, Z.; JI, H.; GONG, G.; ZHANG, X.; TAN, T. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresource Technology*, p. 164, v. 93–99, 2014.

ZHAO, B. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production, *Bioresource Technology*, v. 161, p. 423-430, 2014.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggy wastewater treatment. *Water research*, v. 47, p. 4294-4302, 2013.

Anexo A

Demais Trabalhos Publicados como Resultado da Tese de Doutorado

1. FONTOURA, J.T.; ROTERMUND, S.; RAMIRES, N.; ARAUJO, A.L.; RUBLESKE, M.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Tratamento de Águas Residuais de Curtume com *Scenedesmus* sp.. Revista do Couro, v. Nov/Dez, p. 52 - 57, 2016.
2. FONTOURA, J.T.; ROTERMUND, S.; RAMIRES, N.; ARAUJO, A.L.; RUBLESKE, M.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Tannery Wastewater Treatment with *Scenedesmus* sp.. In: XXXIII International Union of Leather Technologists & Chemists Congress (IULTCS) – Novo Hamburgo/2015. Trabalho completo e apresentação em pôster.
3. FONTOURA, J.T.; ROTERMUND, S.; RAMIRES, N.; RUBLESKE, M.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Removal of nitrogen in tannery wastewater using *Scenedesmus* sp.. In: IV Latin American Congress from the Sociedad Latino Americana de Biotecnologia Ambiental y Algal (IV SOLABIAA) - Florianópolis/2015. Resumo expandido e apresentação em pôster.
4. FONTOURA, J.T.; ROLIM, G.S.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Influência da Intensidade Luminosa e da Concentração de Efluente de Curtume na Produção de Biomassa e na Remoção de Nitrogênio Amoniacal e Fósforo pela Microalga *Scenedesmus* Sp. In: 10º Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental – Porto Alegre/2016. Trabalho completo e apresentação em pôster.
5. FONTOURA, J.T.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Remoção de nutrientes de efluente de curtume pela microalga *Scenedesmus* sp. e potencial utilização da biomassa. In: XV Oktoberforum UFRGS – Porto Alegre/2016.
6. PENA, A.; FONTOURA, J.T.; TRIERWEILER, L.F.; GUTTERRES, M. Treatment of effluent from tannery with consortium of microalgae. In: XXXIV International Union of Leather Technologists & Chemists Congress (IULTCS) – Chennai/2017.
7. PENA, A.; FONTOURA, J.T.; TRIERWEILER, L.F.; GUTTERRES, M. Estudo de um consórcio de microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de

curtume. In: 3º Simpósio de Gestão Ambiental: Territórios Hídricos e Mercados Ambientais, São Francisco de Paula/2017.

Anexo B

Procedimentos experimentais

B1. Preparação do inóculo

Na preparação dos inóculos as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. foram cultivadas em meio Guillard modificado e TAP, respectivamente. O meio Guillard modificado consiste de duas soluções, uma de macronutrientes compreendendo 367,60 mg.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 369,70 mg.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 126,00 mg.L⁻¹ NaHCO₃; 87,10 mg.L⁻¹ K₂HPO₄; 85,10 mg.L⁻¹ NaNO₃; 284,20 mg.L⁻¹ Na₂SiO₃.9H₂O e uma de micronutrientes compreendendo 43,60 mg.L⁻¹ Na₂EDTA; 31,50 mg.L⁻¹ FeCl₃.6H₂O; 0,10 mg.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,22 mg.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,10 mg.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O; 1,80 mg.L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 0,06 mg.L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O. Já meio TAP consiste de 2420,00 mg.L⁻¹ H₂NC(CH₂OH)₃; 375,00 mg.L⁻¹ NH₄Cl; 100,00 mg.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 50,00 mg.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 28,80 mg.L⁻¹ K₂HPO₄; 14,40 mg.L⁻¹ KH₂PO₄; 50,00 mg.L⁻¹ Na₂EDTA.2H₂O; 22,00 mg.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 11,40 mg.L⁻¹ H₃BO₃; 5,00 mg.L⁻¹ MnCl₂.4H₂O; 5,00 mg.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 1,60 mg.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O; 1,60 mg.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 1,10 mg.L⁻¹ (NH₄)₆MoO₃; 1,00 mL.L⁻¹ CH₃COOH. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de volume útil na proporção de 1:10 (20 mL da cultura antecessora para 180 mL de meio de cultura novo). Os inóculos foram mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, intensidade luminosa de 80 μmol photons.m⁻².s⁻¹, temperatura de 25 °C e aeração constante por borbulhamento de ar comprimido a uma taxa de fluxo de 1 L.min⁻¹. A manutenção das microalgas foi realizada com intervalos de 10 dias.

B2. Cultivos das microalgas em efluente de curtume

B2.1 Cultivo de microalgas em Erlenmeyer de 1 L

Nos cultivos da microalga *Scenedesmus* sp. em Erlenmeyer de 1 L foi realizado um planejamento experimental delineamento composto central 2² (DCC) onde a porcentagem de efluente nos cultivos variou entre 20 e 100% e a intensidade luminosa variou entre 80 μmol photons.m⁻².s⁻¹ e 200 μmol photons.m⁻².s⁻¹. O volume de inóculo (na fase exponencial) foi padronizado para todos os ensaios a uma OD₅₇₀ de 0,2. As

culturas foram realizadas em modo batelada durante 24 dias à temperatura ambiente (25 °C). A agitação foi obtida por borbulhamento de ar comprimido (1 L.min⁻¹) no fundo dos frascos.

B2.2 Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de 3 L

Os cultivos das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. foram realizadas em fotobiorreatores Airlift de 3 L, sob intensidades luminosa contínua de 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 20 dias à temperatura ambiente (25 °C). A aeração foi obtida por borbulhamento de ar comprimido a uma taxa de fluxo de 1 L.min⁻¹. O volume de inóculo (na fase exponencial) foi padronizado para todos os ensaios na proporção de 10,0% (v/v), considerando um volume útil final de 2,8 L. As microalgas foram cultivadas em águas residuais de curtumes sem tratamento prévio nas condições porcentagem de efluente de 25%, 50% e 100%. As microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. também foram cultivadas no meio Guillard modificado e TAP, respectivamente, condições esta consideradas controle. Todas as culturas foram realizadas em duplicata.

B2.3 Cultivo de microalgas em recipiente de 5 L

Nos cultivos em recipientes de 5 L as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. foram cultivadas em águas residuais de curtumes sem tratamento prévio e sem adição de nutrientes. O volume de inóculo (na fase exponencial) foi padronizado para todos os ensaios na proporção de 10,0% (v/v), considerando um volume útil final de 4 L. As culturas foram realizadas durante 12 dias à temperatura ambiente (25 °C) com ciclo claro/escuro de 12/12 h (intensidade luminosa 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e aeração continua por borbulhamento de ar na vazão de 1 L.min⁻¹

B3. Avaliação do crescimento da biomassa

B3.1 Densidade ótica

Para monitorar o crescimento das células foi utilizado o método de espectrofotometria visível, com medições no comprimento de onda de 570 nm. Neste procedimento uma alíquota de 4 mL de amostra de cada ensaio foi diariamente coletada (preferencialmente no mesmo horário) e a densidade ótica foi mensurada em um

espectrofotômetro (modelo T80 + UV/Vis, PG Instruments) após a diluição apropriada. Posteriormente, estabeleceu-se uma relação das absorvâncias obtidas neste ensaio com peso seco das amostras através de uma curva de calibração.

B3.2 Determinação de peso seco

O peso de células secas de biomassa de microalgas foi mensurado por gravimetria, onde alíquotas de volumes conhecido foram filtradas em filtros de 0,7 µm de porosidade previamente pesado e secos em estufa a 100 °C durante 24 h. A relação entre peso seco de biomassa e densidade óptica foi estimada utilizando regressão linear.

B4. Caracterização do efluente

B4.1 Nitrogênio Amoniacal

A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada através do método de destilação preliminar/titulométrico. Na etapa de destilação 50 mL de amostra devidamente diluída, foi tratada com 10 mL da solução de hidróxido de sódio/tiosulfato de sódio e encaminhada para um dispositivo de destilação (destilador automático UDK 129 Velp Scientifica) onde foi destilada durante 6 minutos com o hidróxido de sódio 40%. O conteúdo destilado foi coletado em um recipiente contendo 75 mL da solução indicadora de ácido bórico 2%. Nesta operação, a extremidade por onde sai o destilado encontrava-se mergulhada na solução indicadora. Paralelamente, realizou-se a destilação do branco onde a amostra foi substituída por água destilada. Na etapa de titulometria a amostra destilada foi titulada com uma solução de H₂SO₄ 0,02 N até o ponto de viragem do indicador (verde para violáceo). Realizou-se também a titulação para o destilado do ensaio branco.

B4.2 Fósforo

Na determinação do fósforo na forma de ortofosfato, em um erlenmeyer de 125 mL adicionou-se 50 mL de amostra devidamente diluída e 8 mL do reagente combinado (50 mL de ácido sulfúrico 5 N, 5 mL de antimonil tartarato 0,3%, 15 mL de molibdato de amônio 4% e 30 mL de ácido ascórbico 1 M). Após 30 minutos a absorvância foi mensurada em um espectrofotômetro (modelo T80 + UV/Vis, PG Instruments) no comprimento de onda de 880 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando uma solução padrão de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄).

B4.3 Nitrogênio Total e Carbono Inorgânico

A determinação dos parâmetros nitrogênio total (NT) e do carbono inorgânico (CI) foi realizada utilizando um analisador de carbono orgânico total (modelo TOC-L TNM, Shimadzu).

B4.4 DQO

Nos frascos de digestão foram adicionados 20 mL de amostra devidamente diluída, 400 mg de sulfato de mercúrio, 10 mL de dicromato de potássio 0,25 N e 30 mL da solução digestão ácido sulfúrico + sulfato de prata.

Os frascos foram introduzidos em um dispositivo digestivo (sistema de bloco digestor DQO ECO 6 Velp Científica) e após o final do período de aquecimento de 120 min a 150 °C os frascos foram extraídos e resfriados em temperatura ambiente. O conteúdo do frasco foi vertido em um Erlenmeyer de 250 mL juntamente com 60 mL de água destilada. Foram então adicionadas 5 a 6 gotas de solução de ferroína. Após o resfriamento, o conteúdo do Erlenmeyer foi titulado com sulfato ferroso amoniacal 0,125 N até a mudança de cor de azul-verde para laranja.

O mesmo procedimento foi utilizado para a solução controle onde no lugar da amostra foi adicionado 20 mL de água destilada.

B4.5 DBO

Na determinação da demanda bioquímica de oxigênio, foram adicionados nos frascos de DBO₅ 250 mL de amostra devidamente diluída (1:10), 1 mL da solução de sulfito de sódio 15,8%, 1 mL de TCMP - 2-cloro-6 (triclorometil) piridina 0,35%, 1 mL da solução de nutrientes e 2 mL de lodo (semente). Nas amostras controle o efluente foi substituído por água Milliq e não foram adicionadas as soluções de sulfito de sódio e TCMP. Acoplou-se o sensor digital na parte superior do frasco e o mesmo foi encaminhado para incubação a uma temperatura de 20±1 °C. Após 5 dias determinou-se a DBO por meio de leitura direta no sensor digital.

B5. Determinação do teor Proteínas

A percentagem de proteínas totais na biomassa microalgácea seca foi determinada pelo método Kjeldahl modificado (AOAC, 2005). Neste procedimento 100 mg de

biomassa de microalga liofilizada, 5 mL de água destilada, 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 g de mistura catalítica (100 g de K_2SO_4 + 3 g de $CuSO_4$) foram adicionadas em um tubo de Kjeldahl e a mistura foi digerida em um dispositivo digestivo (sistema de bloco digestor DK20 Velp Scientifica) a uma temperatura inicial de 150 °C por 1,5 horas, seguido de uma temperatura de 400 °C por 2,5 horas.

Posteriormente, foi adicionado a mistura 5 mL de tiosulfato de sódio e esta foi encaminhada para um dispositivo de destilação (destilador automático UDK 129 Velp Scientifica) onde foi destilada durante 6 minutos com o hidróxido de sódio e o destilado foi coletado em um erlenmeyer contendo 100 mL de solução indicador de ácido bórico. Após a destilação a mistura foi titulada com uma solução de H_2SO_4 0,3 N. A proteína bruta foi calculada pela multiplicação do nitrogênio total, presente na biomassa seca, pelo fator de conversão convencional de 6,25.

B6. Determinação do teor de Carboidratos

A extração dos carboidratos foi realizada pelo pre-tratamento da biomassa das microalgas com a adição de 2 mL da solução de H_2SO_4 a 0,02 g de biomassa liofilizada. Após o contato por 20 h as amostras foram filtradas através de um filtro de 0,2 μm . O teor total de carboidratos foi determinado pelo método do reagente fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Em 1 mL de amostra pré-tratada e previamente diluída (1:20) adicionou-se 1 mL de solução de fenol (3% p/v) e 5 mL de ácido sulfúrico a 96%. Descansou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. A curva analítica foi preparada usando padrões de glicose e o teor de carboidratos totais de microalgas foi determinado em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

B7. Determinação do teor de Lipídios

Para a determinação de lipídios foi utilizado o método adaptado de Bligh & Dyer (1959), um dos mais aplicados na extração de lipídios em biomassa microalgácea. Inicialmente foi realizada a digestão ácida da biomassa liofilizada.

O processo de extração de lipídios da biomassa das microalgas foi realizado em duas etapas:

Na primeira etapa, da digestão ácida da biomassa, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento com ácido clorídrico para romper a parede celular; e na segunda

etapa, os lipídios foram extraídos com uma mistura de solventes. Após a extração, o excesso de solvente foi removido e a quantificação dos lipídios foi realizada gravimetricamente.

Para o procedimento da digestão ácida da biomassa adicionou-se em um tubo falcon de 15 mL, 500 mg de biomassa de microalgas liofilizada e 5 mL de HCl 2 M. Com o auxílio de um vortex homogeneizou-se a mistura. A mistura foi encaminhada para um banho termostatizado a 80 °C durante 1 h, em seguida foi centrifugada a 3000 g durante 15 minutos para separar a biomassa do resíduo de ácido, então removeu-se o resíduo de ácido e o descartou em frasco adequado para este resíduo.

Posterior ao pré-tratamento, realizou-se o procedimento de extração de lipídios totais, onde adicionou-se 4 mL de metanol à biomassa hidrolisada e homogenizou-se, em seguida acrescentou-se à suspensão 2 mL de clorofórmio e agitou-se em vortex por 2 minutos; adicionou-se mais 2 mL de clorofórmio e agitou em vortex por 2 minutos, e por fim adicionou-se 3,6 mL de água MilliQ e agitou em vortex por 2 minutos. A suspensão foi centrifugada a 3000 g durante 15 minutos. A fase inferior, contendo lipídios e clorofórmio, foi transferida para um balão pesado previamente e reservado.

Para a re-extração dos lipídios adicionou-se 4 mL da solução 10 % v/v de metanol em clorofórmio às fases que restavam e agitou-se em vortex durante 2 minutos. Centrifugou-se novamente e coletou-se a solução inferior transferindo-a para o balão contendo a solução anteriormente extraída. O excesso de clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório a 75 °C sob pressão de vácuo média e o balão foi seco em estufa a 60 °C até obter peso constante.

B6. Produção do biodiesel

B6.1 Procedimento de esterificação

Os ésteres etílicos de ácidos graxos foram obtidos por transesterificação dos lipídios seguindo a metodologia proposta por Guzzato *et al.* (2012).

As transesterificações foram conduzidas em um sistema reacional constituído por um balão de fundo redondo equipado com um condensador de refluxo. A temperatura foi estabilizada a 80 °C e foram realizadas duas etapas consecutivas, usando KOH seguido de H₂SO₄ como catalisadores. Na primeira etapa o etanol (1 mL, 24 mmol) e o triglicerídeo (1 g, 1,2 mmol) foram aquecidos na presença de KOH (12 mg, 0,2 mmol)

por 30 min. Na sequência, uma solução de H₂SO₄ (4,4 µL, 0,8 mmol) em etanol foi adicionada sobre a mistura reacional, a qual foi mantida em aquecimento durante 2 h 30 min.

Após este período, a mistura reacional foi removida do sistema de refluxo e concentrada utilizando um evaporador rotativo para remover o excesso de álcool. A solução foi solubilizada em hexano (5 mL) e lavada com água (2 x 2,5 mL) para a remoção dos catalisadores formando uma fase inferior composta de glicerol e uma pequena quantidade de etanol, esta fase foi removida manualmente. Em seguida a solução foi evaporada novamente a temperatura entre 95 °C e 100 °C. A solução foi então diluída em heptano para posterior leitura no cromatografo gasoso.

B6.2 Análise da composição dos ácidos graxos em CG

A composição e o conteúdo dos ácidos graxos foram determinados em cromatografo gasoso (Shimadzu GC-2010) equipado com detector de ionização de chama, auto-amostrador AOC 20i e coluna OV CARBOWAX 20 M (30 m x 320 µm x 0,25 µm). A temperatura inicial do forno foi mantida a 40 °C durante 2 min e foi subsequentemente aumentada para 230 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e mantida durante 7 min. Um volume de 1 µL foi injetado automaticamente. O gás transportador (hélio) foi controlado a um fluxo de 2,5 mL min⁻¹.