

**Universidade Federal de São Carlos  
Laboratório de Biotecnologia de Algas**

**Estêvão Silveira Freitas**

**Estudo em diferentes concentrações de água residual de petróleo para o crescimento de *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus spinosus*.**

**São Carlos  
2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Estêvão Silveira Freitas**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia da Universidade Federal de  
São Carlos como pré-requisito à obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi

São Carlos  
2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me deu forças e coragem para chegar até aqui, assim como o discernimento para que tudo isso se tornasse possível. Agradeço a Ele por ter me conectado com pessoas que fizeram isso acontecer.

Agradeço aos meus pais Gilson Freitas da Silva e Marina Lemos Silveira Freitas, por me ajudarem a tornar isso uma realidade, por sempre me apoiarem e me cobrarem, sempre confiando em mim, para que eu pudesse me tornar o melhor de mim mesmo. Sem o apoio deles tudo isso não teria se concluído.

Agradeço a minha namorada Leticia Silva de Souza por todos os momentos de compreensão e por todo o acolhimento durante todo esse processo, por todo o apoio e dicas dadas.

Agradeço a meus irmãos Mateus Silveira Freitas e Mariana Silveira Freitas por sempre estarem ao meu lado, desde o início da minha vida e até o fim de mais um ciclo. Agradeço também a minha cunhada Ana Flávia, por compartilhar experiências acadêmicas comigo, clareando minhas ideias.

Agradeço a família formada no meio do caminho, meus amigos da república Amigos do Peito. Sem eles não suportaria o peso de uma graduação, tornaram tudo mais leve e mais feliz. Dentre eles, o Nico, Popeye, Pedrinho, Breno, Flor, Guerra, Júnior, Fê, Marlon, Chris e também a nossa cachorrinha Nala.

Não poderia deixar meus sinceros agradecimentos a Dr.<sup>a</sup> Jaqueline Carmo da Silva que, mesmo não sendo minha orientadora me ajudou na realização deste trabalho, dando todo o apoio necessário e realizando comigo todos os passos feitos aqui. Agradeço também a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi por me ceder o espaço do laboratório e me orientar durante a realização do trabalho. Sem elas isso não teria se concretizado.

## RESUMO

O refinamento do petróleo envolve três etapas, sendo elas de separação, conversão e reforma. Dentro de todas essas etapas há o uso de água, para a obtenção de petróleo refinado. A água que é utilizada é descartada após refinamento e quando descartada no ambiente sem tratamento, introduz compostos orgânicos que podem ser tóxicos aos organismos. As microalgas são organismos fotossintéticos e sensíveis a diversos compostos orgânicos e inorgânicos no meio em que se encontram. Estudos sobre as mudanças fisiológicas servem para um diagnóstico do destino dessa água residual e os impactos nos ecossistemas aquáticos. O objetivo deste trabalho foi analisar os impactos da água residual de produção de petróleo na fisiologia e composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas. Foram cultivadas em meio BG-11 três espécies de microalgas: *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus spinosus* além de suas combinações: *C. sorokiniana* + *D. spinosus*; *C. vulgaris* + *D. spinosus* ; *C. sorokiniana* + *D. spinosus* + *C. vulgaris* em diferentes concentrações de água residual e posteriormente determinada qual concentração apresentou crescimento das algas. Após isso foi selecionada uma concentração de água residual (5%) para o estudo fisiológico e bioquímico das diferentes espécies de microalgas. Os resultados mostraram que a partir de 40% água residual houve inibição do crescimento microalgal. Em 5% de água residual, foi observado que *D. spinosus* teve a taxa de crescimento e a fotossíntese afetadas. As culturas também apresentaram maior peso seco, mais carboidratos que o controle, maior razão de clorofila a/b. Esse trabalho contribui para a compreensão dos mecanismos pelo qual essas espécies de microalgas lidam com as condições geradas pela água residual.

**Palavras-chave:** água residual; fotossíntese; microalgas; petróleo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Crescimento <i>C. sorokiniana</i> em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.....	18
Figura 2 – Crescimento <i>C. vulgaris</i> em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.....	18
Figura 3 – Crescimento <i>D. spinosus</i> em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.....	19
Figura 4 – Crescimento <i>C. sorokiniana</i> + <i>D. spinosus</i> em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.....	19
Figura 5 – Crescimento <i>C. sorokiniana</i> + <i>D. spinosus</i> + <i>C. vulgaris</i> em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.....	19
Figura 6 – Crescimento <i>D. spinosus</i> + <i>C. vulgaris</i> em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.....	19
Figura 7 – Biomassa seca (mg/ml) em <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água residual).....	20
Figura 8 – Taxa de crescimento (d <sup>-1</sup> ) em cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água.....	21
Figura 9 – Carboidratos totais (µg/mL) em <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> cultivadas em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água residual).....	21
Figura 10 – Proteínas totais (µg/mL) em <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> cultivadas em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água residual).....	22
Figura 11 – Razão clorofila a/clorofila b (mg/L) obtida a partir de cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.....	22
Figura 12 – Carotenoides totais (mg/L) obtidos a partir de cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.....	23

Figura 13 – Rendimento quântico máximo obtidos a partir de cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.....	24
Figura 14 – Rendimento quântico efetivo obtidos a partir de cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.....	24
Figura 15 – Dissipação fotoquímica (qP) obtidos a partir de cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.....	25
Figura 16 – Dissipação não-fotoquímica (NPQ) obtidos a partir de cultivos de <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> e <i>D. spinosus</i> em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.....	25
Figura 17 – Curvas rápidas de luz das espécies de microalgas estudadas: taxa de transferência relativa de elétrons (rETR, $\mu\text{mol elétrons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) em função da intensidade de radiação ativa ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para os controles (linha sólida) e os tratamentos com 5% de água residual de petróleo em meio BG11 (linha pontilhada).....	26
Figura 18 – Parâmetros da curva rápida de luz (RLC) para os controles e os tratamentos com 5% de água residual de petróleo em meio BG11. Em <b>a</b> , taxa de transporte de elétrons máxima (ETR <sub>max</sub> ); em <b>b</b> , coeficiente de absorção de luz ( $\alpha$ ); em <b>c</b> , irradiância saturante (E <sub>k</sub> ).....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das espécies de algas usadas no estudo.....	13
Tabela 2 – Descrição das combinações de espécies de algas usadas no estudo....	14

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Produção de energia</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Utilização do petróleo na geração de energia</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Microalgas na remediação de água residual de petróleo</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Objetivos específicos</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>3.1. ETAPA 1</b>	<b>13</b>
3.1.1. Culturas das microalgas	13
3.1.2. Condições do meio de cultivo	14
3.1.3. Determinação da concentração da Água Residual (AR)	14
<b>3.2. ETAPA 2</b>	<b>15</b>
3.2.1. Condições de cultivo	15
3.2.2. Crescimento celular e biomassa seca	16
3.2.3. Parâmetros fotossintéticos	16
3.2.4. Pigmentos	17
3.2.5. Biomoléculas	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Resultados</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Discussão</b>	<b>28</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>32</b>



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Produção de energia**

A produção de energia elétrica no mundo ainda é muito dependente de fontes de combustíveis fósseis, sendo uma delas o petróleo. Os combustíveis fósseis são responsáveis por 63,5% da produção de energia mundial em 2018 (Empresa de Pesquisa Energética, EPE, 2021) e aproximadamente de 81% no ano de 2019 (International Energy Agency, IEA, 2021).

A utilização de fontes fósseis e não renováveis traz consigo a preocupação com seu esgotamento, além de problemas ecológicos na liberação de resíduos, como gases, materiais particulados, águas residuais e poluentes em geral, principalmente na emissão de gases do efeito estufa, dentre eles o dióxido de carbono (FREITAS & DATHEIN, 2013). A tendência mundial para os próximos anos é de que o percentual de uso de energia não renovável diminua e que outras fontes de energia assumam seu lugar, como a energia proveniente de biomassa, energia solar, eólica, e outras fontes renováveis que não prejudiquem o meio ambiente (Empresa de Pesquisa Energética, EPE, 2014).

O Brasil se destaca quanto às fontes de energia renováveis se compararmos com outros países, utilizando majoritariamente fontes hidráulicas de energia (GOLDEMBERG & LUCON, 2007). Essas fontes são mais viáveis e vantajosas, e geram menos impacto ambiental (NASCIMENTO & ALVES, 2016).

### **1.2. Utilização do petróleo na geração de energia**

Para a obtenção de produtos finalizados de petróleo, com valores energéticos e comerciais, como gasolina, diesel, lubrificantes, óleo de aquecimento, dentre outros comercializados, é necessário o refinamento desse petróleo cru. Esse processo se divide em três etapas principais: separação, conversão e reforma (YOUNG, 2006).

A etapa de separação de petróleo ocorre antes mesmo do petróleo bruto entrar na refinaria, sendo separado em petróleo bruto, gás natural e fases de água, e após destilado em produtos como a parafina, óleos, graxa e betume (Abdel-Aal et al., 2016). No processo de conversão são realizadas algumas técnicas como o craqueamento e o hidroprocessamento para o aproveitamento quase integral do petróleo (YOUNG, 2006). Por último, no processo de reforma ocorre a reestruturação da cadeia carbônica sem que os números de carbono sejam alterados, para por exemplo melhorar a qualidade da gasolina (SPEIGHT, 2016).

Dentre todas essas etapas, há a utilização de água para a realização de processos essenciais do refinamento, principalmente as torres de geração de vapor e de resfriamento (SPEIGHT, 2016). No Brasil o volume de petróleo refinado em 2021 foi de aproximadamente 105.500.000 m<sup>3</sup>, gerando um consumo aproximado de 100.225.000 m<sup>3</sup> d'água, segundo o ICA das refinarias (ANP, 2022).

### **1.3. Microalgas na remediação de água residual de petróleo**

Águas residuais de petróleo são águas descartadas após o uso no refinamento do petróleo, geralmente provenientes da própria rocha, reservatório ou poços de injeção (BARROS, 2015). Não têm potencial econômico e muitas vezes são problemas para a indústria, causando corrosão e incrustação nas instalações de transporte, produção e refino (KUNERT, 2007). Quando descartada no ambiente introduz compostos orgânicos que podem ser tóxicos aos organismos.

As microalgas são organismos fotossintéticos de crescimento rápido e são os principais produtores primários da cadeia alimentar. Esses organismos são sensíveis a uma variedade de tóxicos orgânicos e inorgânicos (Ramakrishnan et al. 2010).

A utilização de seres vivos para remover, degradar ou alterar poluentes ambientais é conhecida como biorremediação e, as microalgas têm demonstrado grande potencial para essa técnica. As microalgas são adequadas para aplicações de biorremediação, especialmente em corpos de água contaminados por nutrientes, tais como ambientes eutrofizados (DIAS, 2019). Entretanto, o uso de microalgas para remediar efluentes tóxicos é mais complexo e demanda a seleção as cepas adequadas e otimizar as condições de crescimento, sendo estas algumas das

dificuldades que se pode citar ao pensar em microalgas como organismos remediadores. A eficiência da biorremediação utilizando de microalgas também pode ser afetada por várias variáveis, como a química da água, temperatura, disponibilidade de luz e concentrações de nutrientes (LEON & CHANG, 2020).

Portanto, estudos sobre mudanças fisiológicas e bioquímicas nesses organismos são uma ferramenta de diagnóstico essencial para analisar o destino dos resíduos e os impactos decorrentes do descarte indevido da água de petróleo nos ecossistemas.

Esta pesquisa buscou entender a fisiologia de algumas microalgas Chlorophyta submetidas à água residual da produção de petróleo e assim contribuir com a tecnologia da remediação de efluentes industriais utilizando-se de microrganismos vivos.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar a fisiologia e composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas Chlorophyta quando submetidas à água residual da exploração de petróleo. Para tanto as cepas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* e *Desmodesmus spinosus* foram utilizadas.

### 2.1. Objetivos específicos

- Selecionar concentrações de água residual que não afetem significativamente a taxa de crescimento das algas.
- Analisar a composição bioquímica (carboidratos, proteínas e pigmentos) das cepas de microalgas cultivadas na água residual da extração de petróleo.
- Estudar a fotossíntese das cepas em concentração de água residual da extração de petróleo previamente selecionada.
- Avaliar o potencial biorremediador das cepas selecionadas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ETAPA 1

##### 3.1.1. Culturas das microalgas

Três espécies de microalgas foram cultivadas: *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss 1965 (211-32) oriunda do Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese (IBVF), Universidade de Sevilla, Espanha. *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (014) oriunda do Laboratório de Biotecnologia de Algas (UFSCar) e *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E.Hegewald 2000 (062) oriunda do CCMA, UFSCar. Essas algas foram cultivadas de forma isolada e em três combinações: *C. sorokiniana* + *D. spinosus*; *C. vulgaris* + *D. spinosus*; *C. sorokiniana* + *D. spinosus* + *C. vulgaris*.

Todas as cepas foram obtidas do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Estas espécies foram escolhidas com base em seu potencial de crescimento em águas residuais e pelo seu potencial bioquímico, incluindo pigmentos e outras moléculas de alto valor (CANDIDO & LOMBARDI, 2020).

**Tabela 1:** Descrição das espécies de algas usadas no estudo.

Espécie	Morfologia	Característica Principal	Referência
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Esférica	Cresce bem em condições mixotróficas	(KIM, 2013)
<i>Desmodesmus spinosus</i>	Oblonga	Presença de células externas menores que as internas	(ROSINI et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esférica	Cresce bem em diversos substratos, incluindo águas residuais	(CANDIDO, 2018)

**Tabela 2:** Descrição das combinações de espécies das microalgas usadas neste estudo.

Espécies combinadas	Combinação
<i>Chlorella sorokiniana</i> + <i>Desmodesmus spinosus</i>	a
<i>Chlorella vulgaris</i> + <i>Desmodesmus spinosus</i>	b
<i>Chlorella sorokiniana</i> + <i>Desmodesmus spinosus</i> + <i>Chlorella vulgaris</i>	c

### 3.1.2. Condições de cultivo

As microalgas foram cultivadas em água residual de petróleo obtida durante o processo de extração do petróleo. A água residual foi filtrada em membranas de 0,45  $\mu\text{M}$  e foi adicionada em diferentes concentrações ao meio de cultivo BG-11, que fora previamente autoclavado (20 min, 121 °C, 1 bar; AV Phoenix Luferco, Brasil).

Os cultivos foram mantidos sob condições controladas, ficando expostos à intensidade luminosa de 150  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  à partir da base do frasco, temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C e 12:12 h ciclo claro:escuro. O experimento teve duração de 96 horas e foi feito em triplicata.

### 3.1.3. Determinação da concentração da Água Residual (AR)

Para determinar a concentração de AR que seria utilizada para avaliar a fisiologia e composição bioquímica das microalgas, um experimento foi realizado foi realizado durante 96 h, em que as microalgas isoladas e em combinação foram cultivadas em microplaca de 96 poços. A microplaca foi iluminada por baixo e avaliou-se o crescimento populacional por meio de medidas em espectrofotômetro (absorbância 684 nm), realizadas diariamente. O comprimento de onda de 684 nm determina moléculas clorofiladas, portanto as análises de taxa de crescimento se basearam nele. Os dados obtidos foram utilizados para a plotagem de curvas de crescimento referentes ao tempo e dessas curvas foram calculadas as taxas de crescimento específicas ( $\mu$ ,  $\text{d}^{-1}$ ).

A partir desses resultados, foram determinadas as concentrações de água residual onde melhor ocorreram o crescimento das cepas de microalgas e determinados quais espécies tiveram a maior taxa de crescimento. A densidade inicial de células foi  $1 \times 10^5$  cels mL<sup>-1</sup>. Neste ensaio das microplacas foram utilizadas dez concentrações da água residual, sendo: 0% (somente meio BG-11), 0,5%, 5%, 8%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% (somente água residual). Salientamos que mesmo variando-se a concentração de água residual utilizada, a concentração de nutrientes no meio de cultura experimental (água residual + meio BG11) foi mantida a mesma que no controle.

## 3.2. ETAPA 2

Nesta etapa, as microalgas foram cultivadas na melhor condição de crescimento e na porcentagem de água residual onde houve crescimento similar ao controle com a finalidade de avaliar o processo fotossintético e a composição bioquímica das células.

### 3.2.1. Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados com duas concentrações diferentes, sendo elas: 0% (apenas meio BG-11) e 5% de AR. Nesta etapa, as microalgas *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus spinosus* foram cultivadas de forma isolada. O inóculo inicial, em fase exponencial, teve a concentração inicial de  $10^5$  cel/ml. Durante essa segunda etapa, as condições de cultivo mantiveram-se as mesmas da Etapa 1. Foram utilizados Erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de cultura e o experimento foi realizado em triplicata.

Durante o período experimental foram analisados diariamente a densidade celular, o rendimento quântico fotossintético máximo e clorofila *a in vivo*. Ao final da fase exponencial (72 h) foram determinadas as concentrações de carboidratos e proteínas totais, pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides totais), biomassa

seca, rendimento quântico fotossintético efetivo, dissipação fotoquímica e não fotoquímica e curva rápida de luz.

### 3.2.2. Crescimento populacional e biomassa seca

Para o monitoramento do crescimento celular, as amostras de culturas foram retiradas diariamente e contadas em um citômetro de fluxo (MUSE®, Merck-USA). Os valores foram utilizados para a plotagem de curvas de crescimento em função do tempo. Dessas curvas foram calculadas as taxas de crescimento específicas ( $\mu$ ). Isso foi feito utilizando-se ajuste linear da fase exponencial de crescimento. Para tanto plotou-se o logaritmo natural do número de células em função do tempo experimental. A concentração de clorofila *a in vivo* foi determinada utilizando-se um fluorímetro digital (Turner Designs, USA). No último dia de análises foi quantificada a concentração de biomassa seca (gravimetria) através da pesagem do filtro de acetato de celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ) utilizando balança analítica de alta precisão (Mettler - Toledo).

### 3.2.3. Parâmetros fotossintéticos

Para o monitoramento dos parâmetros fotossintéticos, foi utilizada a técnica de fluorescência por amplitude de pulso modulada (Analisador de Fitoplâncton, PHYTO-PAM, Heinz Walz, Alemanha). Amostras de culturas foram analisadas diariamente para o rendimento máximo ( $\phi_M$ ) e, para tal, antes da análise as células foram adaptadas ao escuro durante 20 minutos. O rendimento efetivo ( $\phi'_M$ ) e a dissipação da fluorescência (NPQ e qP) foram determinados em culturas de 72 h. Essas amostras foram adaptadas à intensidade de 128  $\mu\text{mol}$  fótons e seguiram as equações descritas em Juneau et al. (2002), mostradas abaixo.

$$\phi_M = F_M - F_0/F_M \quad (1)$$

$$\phi'_M = (F'_M - F'_s)/F'_M \quad (2)$$

$$qP = F'_M - F_s/F'_M - F'_0 \quad (3)$$

$$\text{NPQ} = [F_M - F'_M]/F'_M \quad (4)$$



$$F'_o = F_o / ([F_v/F_M] + F_o/F'_M) \quad (5)$$

A curva rápida de luz foi obtida em amostras de culturas de 72 horas, usando configurações pré-estabelecidas no Phyto PAM. Para esse tipo de estudo, aplica-se sobre as amostras pulsos com intensidade crescentes de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) a cada 20 segundos. O valor da taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) foi calculado para cada intensidade de luz a partir da multiplicação do PAR ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pelo rendimento efetivo. As curvas foram ajustadas seguindo o modelo proposto por Platt et al. (1980).

#### **3.2.4. Pigmentos**

A determinação da concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais seguiu a metodologia espectrofotométrica descrita em Wellburn (1994), tendo como solvente de extração o DMSO. Os três comprimentos de onda utilizados foram 665, 649 e 480 nm.

#### **3.2.5. Biomoléculas**

Para a determinação de proteínas totais foram usados 20 mL de amostras de cultura que foram centrifugadas. A quantificação foi realizada pelo método espectrofotométrico baseado no protocolo descrito por Slocombe et al. (2013) adaptado, no qual foi utilizado 10% de TCA para o processo de extração.

A determinação de carboidratos totais foi realizada por método espectrofotométrico descrito em Albalasmeh et al. (2013). Este método é baseado na reação de ácido sulfúrico com a biomassa algal.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados

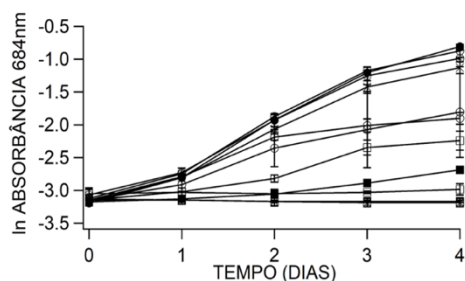
#### Etapa 1

As três espécies de microalgas (Tabela 1) e as três combinações dessas espécies (Tabela 2) foram comparadas quanto ao potencial de crescimento em diferentes concentrações de água residual proveniente da produção de petróleo. As curvas de crescimento são apresentadas nas Figuras de 1 a 6.

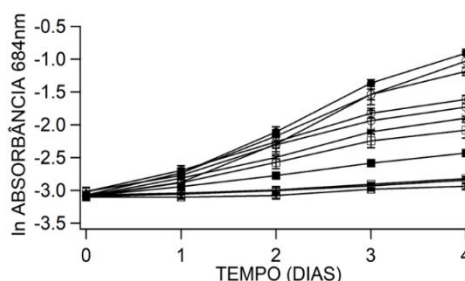
Na Figura 1 os resultados obtidos mostram que houve o crescimento da espécie *C. sorokiniana* em diferentes concentrações de água residual, destacando as concentrações de 0,5% e 5%, onde houve maiores taxas de crescimento.

Na Figura 2, *C. vulgaris* apresentou maiores taxas de crescimento em concentrações de 0% e 0,5%, porém quando comparado com as taxas de *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* apresenta taxas menores. Já para a curva de crescimento de *D. spinosus*, Figura 3, as maiores concentrações para o crescimento foram de 0,5% e 1%, também não superando os valores de absorvância da espécie *C. sorokiniana*. Para as combinações de espécies, como evidenciado nas Figuras 4, 5 e 6, os resultados mostraram um maior crescimento de cultura em concentrações de 0%, 0,5% e 5%.

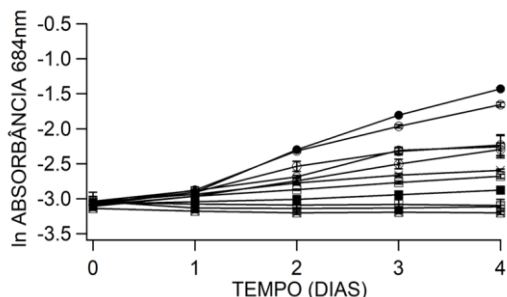
**Figura 1** - Crescimento *C. sorokiniana* em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.



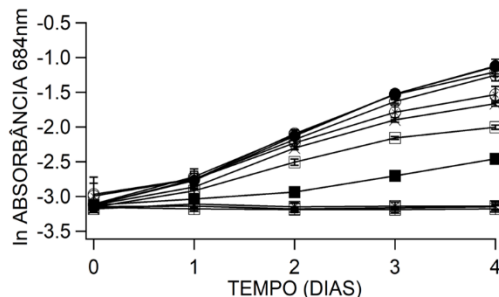
**Figura 2** - Crescimento *C. vulgaris* em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.



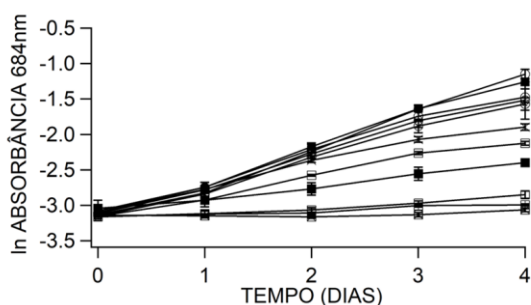
**Figura 3** - Crescimento *D. spinosus* em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.



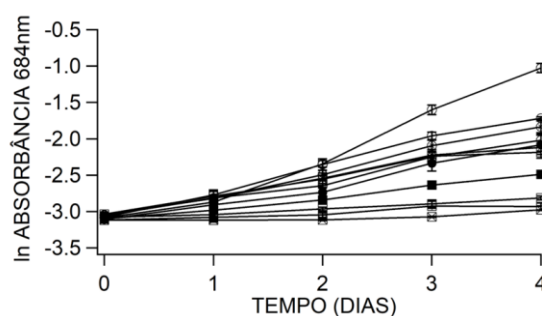
**Figura 4** - Crescimento *C. sorokiniana* + *D. spinosus* em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.



**Figura 5** - Crescimento *C. sorokiniana* + *D. spinosus* + *C. vulgaris* em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.



**Figura 6** - Crescimento *D. spinosus* + *C. vulgaris* em meio de cultura BG 11 e diferentes concentrações de água residual.



De todas as espécies analisadas, a cultura de *C. sorokiniana* isolada obteve as maiores taxas de crescimento, em água residual, em relação às outras espécies analisadas, alcançando seu crescimento máximo em concentração de 0,5% de água residual (Figura 1), com a concentração de 5%, superando o controle.

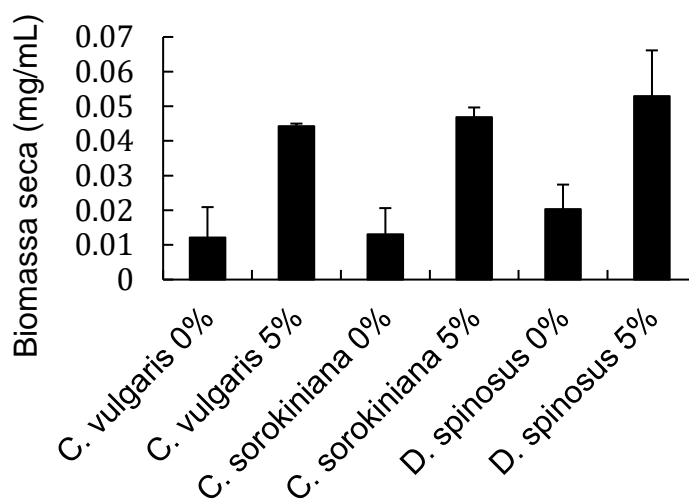
A partir de 20% de concentração de água residual observamos reduções significativas das taxas de crescimento em todas as espécies e combinações. Considerando os resultados em relação às taxas de crescimento, a concentração de água residual 5% foi selecionada para avaliar a fisiologia e composição bioquímica das três espécies de microalgas.

## Etapa 2

Na Etapa 2, seguiram as comparações entre as espécies, onde foram realizadas análises fisiológicas e bioquímicas para avaliar a água residual na concentração de 5%. Nesta concentração as espécies não tiveram a taxa de crescimento afetada.

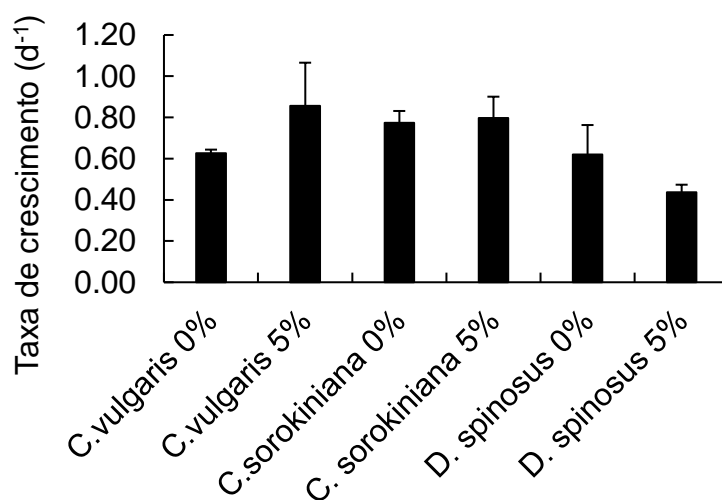
A Figura 7 apresenta os valores de biomassa seca (mg/mL) de todas as amostras. Nela, todas as espécies cultivadas em 5% de água residual apresentaram os maiores valores, 4 vezes, em comparação ao controle.

**Figura 7** - Biomassa seca (mg/ml) em *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água residual).



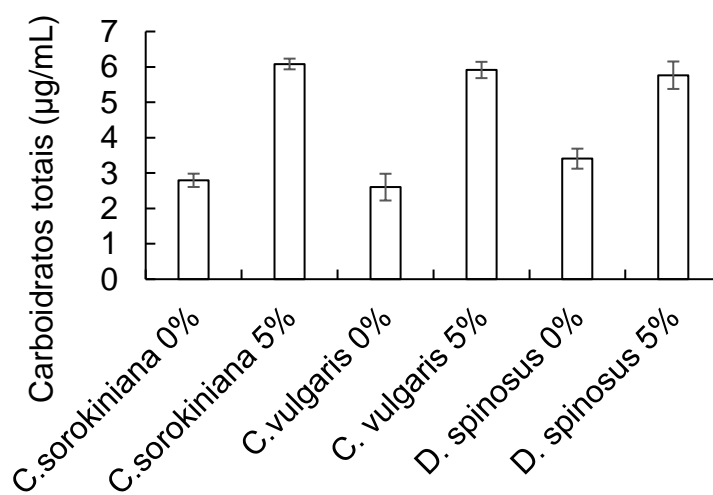
Na Figura 8 são apresentados os valores da taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) das três microalgas em 5% de água residual e no controle. Os resultados obtidos mostram que a taxa de crescimento de *C. vulgaris* no tratamento 5% de AP difere significativamente da taxa obtida para *D. spinosus* 5% ( $p < 0,05$ ), no entanto, não difere das taxas observadas para *C. sorokiniana* e *D. spinosus* cultivadas no controle ( $p > 0,05$ ).

**Figura 8** - Taxa de crescimento ( $d^{-1}$ ) em cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água



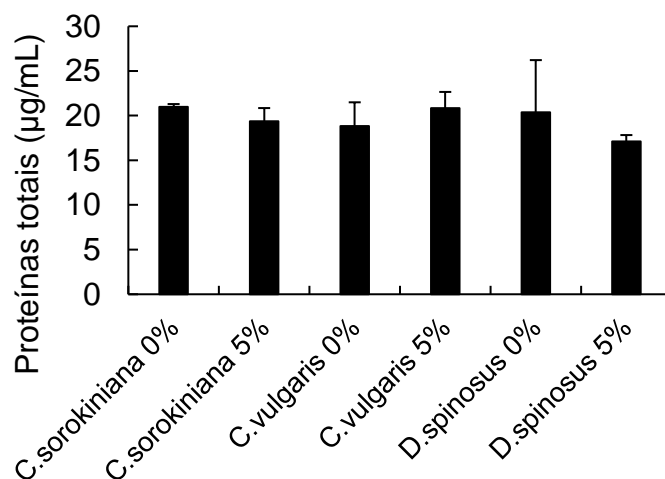
Os resultados dos carboidratos totais para cada espécie nos respectivos tratamentos (Figura 9) mostram maiores concentrações em 5% de água residual em relação ao controle, o aumento observado difere significativamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9** - Carboidratos totais ( $\mu g/mL$ ) em *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* cultivadas em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água residual).



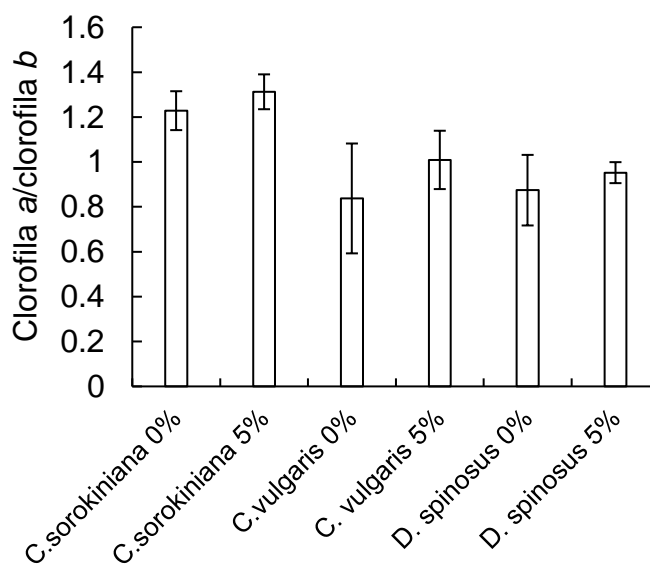
A Figura 10 mostra a concentração de proteínas totais para cada espécie nos diferentes tratamentos. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa para a concentração de proteínas ( $p>0,05$ ).

**Figura 10** - Proteínas totais ( $\mu\text{g/mL}$ ) em *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* cultivadas em meio BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles (0% água residual).



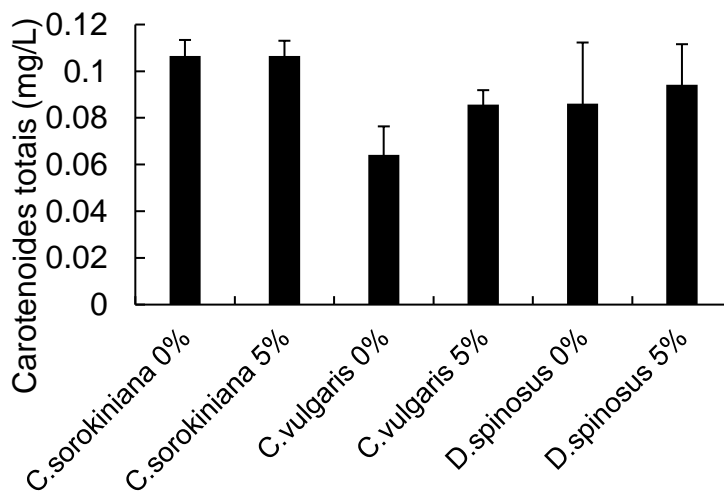
A razão clorofila *a*/clorofila *b* (mg/L), Figura 11, mostra que *C. vulgaris* em 0% foi significativamente diferente da razão observada para *C. sorokiniana* 5% ( $p<0,05$ ); para os outros cultivos não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). A razão variou de 0,8 para 1,3.

**Figura 11** - Razão clorofila *a*/clorofila *b* (mg/L) obtida a partir de cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.



Os resultados de carotenoides totais, Figura 12, apontam que não houve diferença significativa entre os tratamentos para esse pigmento ( $p>0,05$ ).

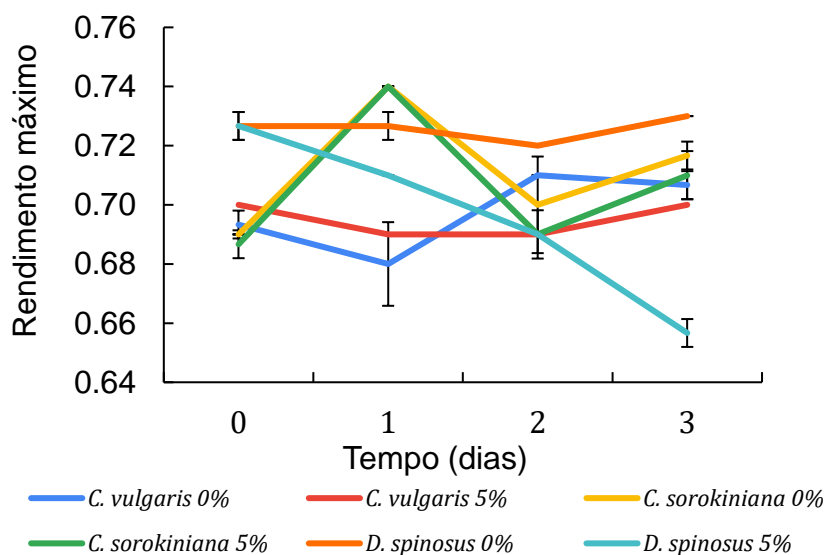
**Figura 12** - Carotenoides totais (mg/L) obtidos a partir de cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.



### Parâmetros fotossintéticos

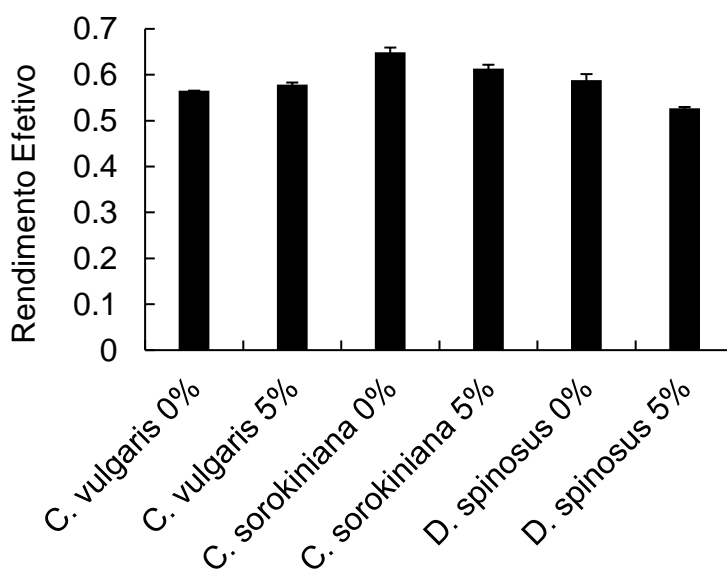
O rendimento quântico fotossintético máximo (Figura 13), aponta que a espécie *D. spinosus* em 5% teve a fotossíntese afetada a partir de 24 h de cultivo, reduzindo de 0,73 para 0,66, enquanto no controle os resultados se mantiveram similares durante todo tempo de cultivo. A microalga *C. sorokiniana* apresentou um valor máximo de 0,74 no dia 1, com quedas após esse tempo, porém bem próximos em ambas as concentrações. A espécie *C. vulgaris* em 5% apresentou taxas de rendimento que permaneceram semelhantes nos quatro dias, ao mesmo tempo em que o controle teve um pico no dia 2. Todas as amostras no controle apresentaram maior rendimento em relação aos cultivos na água residual.

**Figura 13** - Rendimento quântico máximo obtidos a partir de cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.



A média de rendimento efetivo apresentou diferença significativa entre as amostras (Anova  $p < 0,05$ ; Fig. 14), sendo a *C. sorokiniana* na condição controle a que apresentou o maior rendimento efetivo em relação às outras algas e tratamentos.

**Figura 14** - Rendimento quântico efetivo obtidos a partir de cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.

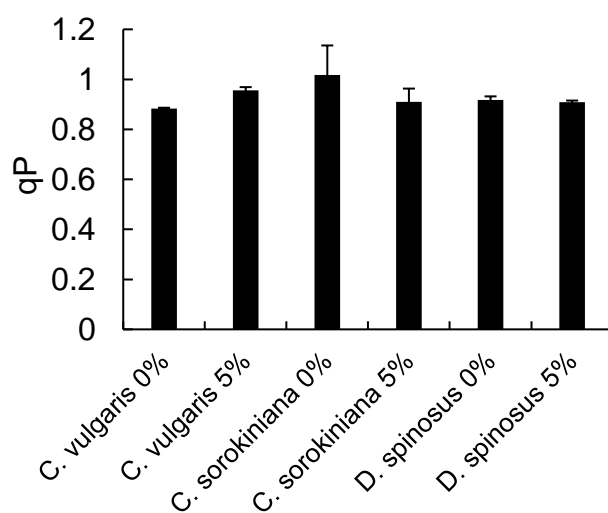




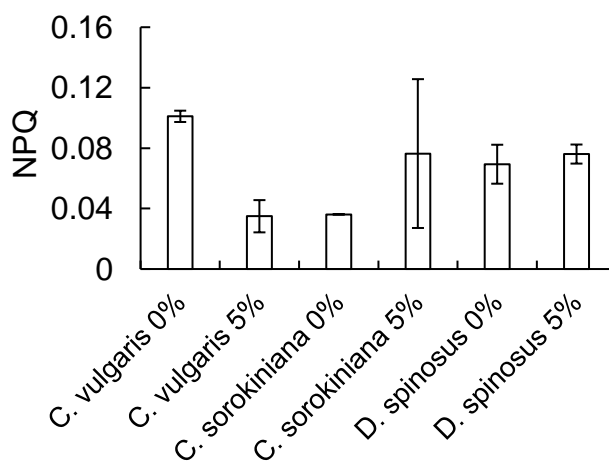
Apesar de ter observado diferença nos rendimentos efetivos, os resultados relacionados à dissipação fotoquímica (qP; Figura 15), mostraram que não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) e os valores desse parâmetro foram próximos a 1,0.

Os resultados relacionados à dissipação não-fotoquímica (NPQ), apresentada na Figura 16, demonstram que os valores das dissipações ficaram entre 0,04 e 0,1 e não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ).

**Figura 15** - Dissipação fotoquímica (qP) obtidos a partir de cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.

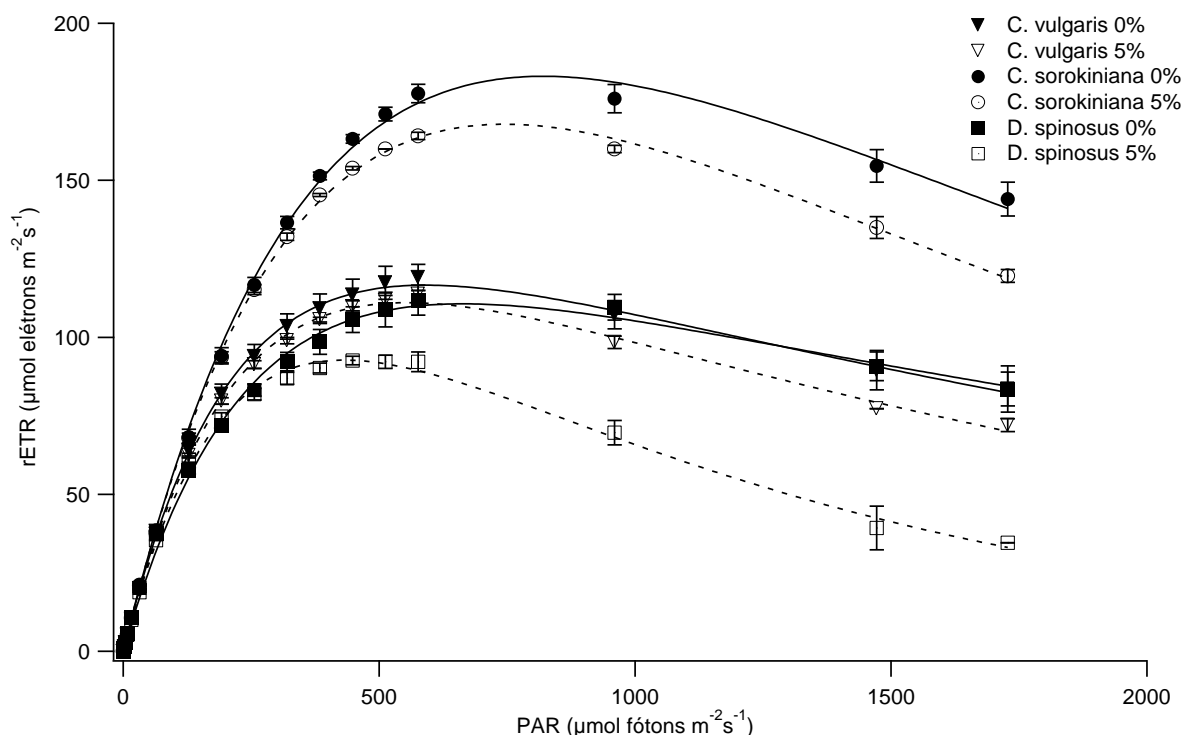


**Figura 16** - Dissipação não-fotoquímica (NPQ) obtidos a partir de cultivos de *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e *D. spinosus* em BG11 com 5% de água residual e os respectivos controles.



As curvas rápidas de luz (RLC), apresentadas como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) em função da intensidade de luz fotossinteticamente ativa, são mostradas na Figura 17. De modo geral, quando cultivadas na água residual a rETR máxima sofre redução em relação ao controle, exceto para *C. vulgaris*, em que as curvas foram similares em ambos os tratamentos. *D. spinosus*, cultivada em 5% de água residual apresentou a RLC com a menor amplitude.

**Figura 17** - Curvas rápidas de luz das espécies de microalgas estudadas: taxa de transferência relativa de elétrons (rETR,  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) em função da intensidade de radiação ativa ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para os controles (linha sólida) e os tratamentos com 5% de água residual de petróleo em meio BG11 (linha pontilhada).



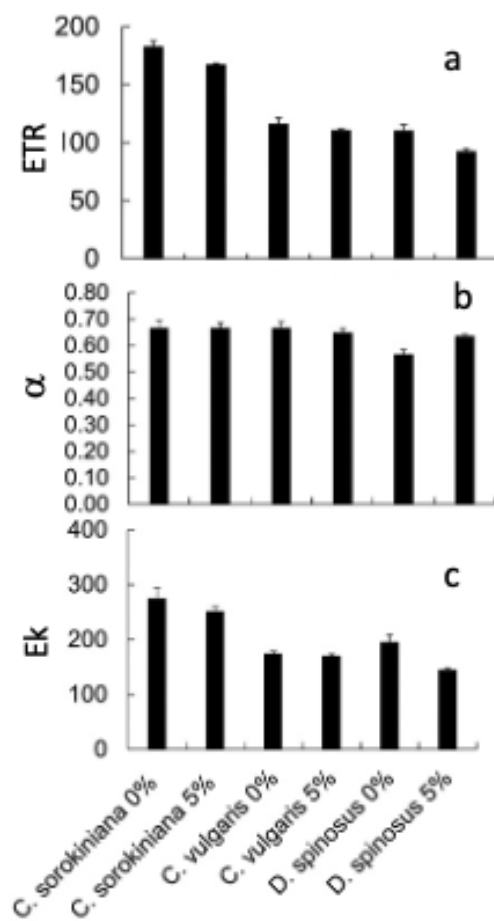
Na Figura 18 estão apresentados os parâmetros calculados a partir das curvas rápidas de luz. As médias da taxa de transporte de elétrons relativa máxima (ETRmax) são apresentadas na Figura 19a. Os resultados da ETRmax diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ). *C. sorokiniana* foi a espécie que apresentou a maior ETRmax independentemente do tratamento, 180  $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , no controle e 160 em 5% de AP. *C. vulgaris* e *D. spinosus* 0% apresentaram ETRmax de 120

$\mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em ambos os tratamentos, e a análise estatística não mostrou diferença significativa entre essas espécies. No entanto, *D. spinosus* no tratamento de 5% de AP apresentou a menor ETRmax entre as espécies e tratamentos ( $p < 0,05$ ).

A Figura 18b reporta os valores do coeficiente de absorção de luz ( $\alpha$ ). *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* e *D. spinosus* 5% obtiveram valores próximos e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ), enquanto *D. spinosus* 0% apresentou a menor média diferindo significativamente das outras espécies e tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Médias de irradiância saturante (EK) são mostradas na Figura 18c, sendo *C. sorokiniana* cultivada sem a presença de água residual a que obteve maiores valores e *D. spinosus* cultivada em 5% de concentração, os menores ( $p < 0,05$ ). Para *C. vulgaris* não houve diferença entre os tratamentos ( $p > 0,05\%$ ).

**Figura 18** - Parâmetros da curva rápida de luz (RLC) para os controles e os tratamentos com 5% de água residual de petróleo em meio BG11. Em **a**, taxa de transporte de elétrons máxima (ETRmax); em **b**, coeficiente de absorção de luz ( $\alpha$ ); em **c**, irradiância saturante (EK).



## 4.2 Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que a água residual da produção de petróleo a partir da concentração de 40% afetou significativamente o crescimento populacional das três espécies cultivadas. Esse resultado está de acordo com Marques (2019), que observou que a água de petróleo a partir de 50% afetou o crescimento de *Nannochloropsis oculata*.

Em relação ao crescimento das espécies de microalgas cultivadas em 5% de água de petróleo contendo os nutrientes presentes no meio BG11, os resultados deste trabalho vão de acordo com os descritos por Stablein et al. (2021), que também cultivou microalgas em água residual. Os autores cultivaram cinco espécies de microalgas em diferentes concentrações de água residual pós processo de liquefação hidrotérmica e mostraram que houve crescimento para algumas cepas e inibição para outras. Foram utilizadas as espécies *Chlorolobion braunii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Muriella decolor* e *Scenedesmus quadricauda*, nas concentrações de água de 0 a 5%. No estudo, o maior crescimento foi observado em *C. sorokiniana* em relação às outras espécies. Diferentemente de nosso estudo, Stabelin et al. (2021) observaram que *C. sorokiniana* em água residual 3% superou o controle. Os autores atribuem tal crescimento ao crescimento autotrófico normal e ao uso de nutrientes orgânicos do meio. Em nosso estudo, não podemos desconsiderar eventuais nutrientes orgânicos e/ou inorgânicos fornecidos pela água residual (ZACHLEDER et al., 2016). Água residual de petróleo tem como constituintes ácidos de cadeia curta, aminas, amidas, compostos nitrogenados, piridinol, metais, graxas, dentre outros (MARQUES, 2019). Alguns desses componentes podem estimular o crescimento da alga, outros apresentam efeitos inibitórios, como já descrito na literatura.

A razão entre as clorofilas a e b pode ser indicativo das condições nutricionais das células e como elas respondem à água residual. Em Stablein et al. (2021) a razão entre clorofila a e b para todos os testes diminuíram em relação ao controle, porém no presente estudo não houve alteração nos tratamentos com água residual. Mudanças nas concentrações de pigmentos tendem acontecer como uma resposta ao estresse, onde o aumento de clorofila a beneficia na captação de luz e o aumento dos carotenóides faz-se necessário para a dissipação da energia obtida pela clorofila (NOVOVESKÁ et al., 2019). Esse acúmulo de carotenóides em algas cultivadas em

águas residuais pode fornecer uma maior tolerância contra oxigênio reativo. Já o aumento de clorofila *b* pode ser explicado pela necessidade de transferência da energia para clorofila *a* e no controle do complexo antena (FRIEDLAND et al. 2019). Podemos considerar que nossos resultados mostraram que as algas cultivadas na água residual na concentração de 5% se adaptaram às condições de cultivo, visto que sobreviveram e sua composição de pigmentos não foi alterada.

Todas as espécies expostas à água residual apresentaram maior biomassa seca em relação ao controle, resultado também visto em Stablein et al. (2021). Esse resultado indica que as células estão ativas, porém não necessariamente se dividem. O aumento da biomassa também pode ser explicado pelo aumento de carboidratos nas espécies cultivadas em 5% de concentração de água residual. O aumento de carboidratos pode estar relacionado à algum mecanismo de defesa contra os possíveis metais presentes na água residual da produção de petróleo. O acúmulo de carboidratos em função da exposição aos metais é descrito na literatura e ocorre para reduzir a biodisponibilidade dos íons, e conseqüentemente a toxicidade (Silva et al., 2018; Baracho et al., 2019). No entanto, essa possível toxicidade não promoveu o aumento de proteínas, biomoléculas que tendem a aumentar para reduzir os efeitos tóxicos ocasionados pelos íons metálicos (Silva et al., 2018; Baracho et al., 2019).

A eficiência fotossintética não foi afetada pela água de petróleo. Observamos que ao longo dos cultivos as células se mantiveram em condições saudáveis (rendimento quântico máximo acima de 0,70), exceto *D. spinosus*, que em 5% de concentração de água residual, que teve os rendimentos quânticos afetados. O rendimento quântico máximo está relacionado ao estado fisiológico das células, segundo a literatura valores acima de 0,7 indicam que as células estão saudáveis (Lombardi e Maldonado, 2011).

A similaridade dos valores de qP e NPQ para todos os tratamentos sugere que as células não estavam sob estresse. Os valores de qP mantiveram-se próximo de 1, ou seja, 100% da luz seguindo para a fotoquímica da fotossíntese. Como qP está relacionado ao estado redox da plastoquinona A ( $Q_A$ ), o primeiro aceptor de elétrons da cadeia transportadora de elétrons entre PSII e PSI, podemos sugerir que se qP foi similar ao controle, então as clorofilas e o sistema-antena não foram afetados (Krause, 2003). Isso é corroborado pela síntese das clorofilas, que como mostrado,

não foi afetada. Os valores de NPQ mantiveram-se baixos, em torno de 0,1. NPQ é uma variável relacionada à proteção contra excesso de luz e pode aumentar em situações de toxicidade (Dewez et al. 2005). Segundo Juneau e Harrison (2005), a toxicidade limita a transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, aumentando a dissipação não-fotoquímica reduzindo a formação de ATP e NADPH. Nas nossas culturas, de um modo geral, a água de petróleo não aumentou a dissipação de energia na forma de calor (NPQ). Esse fato sugere que os compostos e salinidade presentes na água não alteraram o aparato fotossintético das microalgas.

Os resultados relativos aos parâmetros da curva rápida de luz (ETR<sub>max</sub>, EK e  $\alpha$ ) sugerem que *D. spinosus* em 5% de água da produção petróleo estava sob condição de estresse, porém com o aparato fotossintético preservado, corroborado pelos valores de qP similar ao controle. Os nossos resultados vão de encontro aos de Candido e Lombardi (2018), que relataram que *C. vulgaris*, quando cultivada em vinhaça, efluente da produção de etanol a partir da cana de açúcar, apresentou qP similar ao controle e menores valores de ETR<sub>max</sub>,  $\alpha$  e Ek. Esse comportamento foi atribuído pelas autoras ao processo de mixotrofia, no entanto, para o nosso caso não podemos afirmar que o mesmo processo metabólico tenha ocorrido, uma vez que ao ser cultivada na água de petróleo, *D. spinosus* teve redução da taxa de crescimento. Os resultados de RLC demonstram que mudanças no aparato fotossintético ocorreram em *D. spinosus*, porém a síntese e manutenção da concentração dos pigmentos foram mantidas como um processo de adaptação à água de petróleo.

## 5. CONCLUSÃO

O crescimento das espécies *Chlorella sorokiniana*, *C. vulgaris* e *Desmodesmus spinosus* foi estudado em concentrações de até 100% de água residual de petróleo, diluídos em meio BG-11, e a partir de 40% ocorreu inibição do crescimento das microalgas.

Ao ser cultivada em 5% de água residual de petróleo *Chlorella sorokiniana* e *C. vulgaris* foram as espécies mais resistentes à água residual, enquanto *D. spinosus*, a mais sensível, tendo o crescimento e a fotossíntese mais afetados na presença da água residual, visto no rendimento máximo e na curva de luz. A água residual a 5% estimulou a produção de carboidratos.

A obtenção de biomassa de microalgas obtidas na presença de água residual da produção de petróleo pode encontrar aplicação na produção de biocombustível, uma vez que elevada produção de carboidratos foi obtida na presença do resíduo.

Este trabalho é uma contribuição para a compreensão dos mecanismos pelo qual essas espécies de microalgas lidam com as condições fornecidas pela água residual da produção de petróleo, mostrando suas interferências no crescimento e na taxa de fotossíntese e, portanto, para suas possíveis aplicações como agentes para a biorremediação.

## 6. REFERÊNCIAS

ABDEL-AAL, Hussein K.; AGGOUR, Mohamed A.; FAHIM, Mohamed A. **Petroleum and gas field processing**. CRC press, 2015.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA (IEA). Key World Energy Statistics 2021: Supply. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/key-world-energy-statistics-2021/supply#oil>. Acesso em: 06 fev. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Home page. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br>. Acesso em: 04 fev. 2022.

BARACHO, Douglas H.; SILVA, Jaqueline C.; LOMBARDI, Ana T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. **Journal of phycology**, v. 55, n. 6, p. 1335-1347, 2019.

BARROS, Daniel Pereira Maurício de; GUIMARÃES, Iliana de Oliveira. ÁGUAS RESIDUAIS DA INDÚSTRIA PETROLÍFERA: UMA INTRODUÇÃO. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 1., 2015, Campina Grande. **Anais CONEPETRO**. Campina Grande: Realize, 2015.

BOELEEE, N. C. et al. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. **Water research**, v. 45, n. 18, p. 5925-5933, 2011.

CANDIDO, Camila; LOMBARDI, Ana Teresa. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 20, 2020.

CANDIDO, Camila; LOMBARDI, Ana Teresa. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal research**, v. 30, p. 79-85, 2018.

DE WILT, Arnoud et al. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. **Journal of hazardous materials**, v. 304, p. 84-92, 2016.

DEWEZ, David et al. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. **Aquatic toxicology**, v. 74, n. 2, p. 150-159, 2005.

DIAS, Guilherme et al. Biorremediação de efluentes por meio da aplicação de microalgas-uma revisão. **Química Nova**, v. 42, p. 891-899, 2019.

ELICKER, Carolina et al. Estudo da utilização da biomassa de cianobactérias como matéria-prima para a síntese de biodiesel através da reação de esterificação in situ. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2497-2508, 2015.



EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Home page. Disponível em: <http://www.epe.gov.br>. Acesso em: 04 fev. 2022.

FRIEDLAND, N. et al. Fine-tuning the photosynthetic light harvesting apparatus for improved photosynthetic efficiency and biomass yield. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13028, 2019.

GOLDEMBERG, José; LUCON, Oswaldo. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos avançados**, v. 21, p. 7-20, 2007.

HODGSKISS, Logan H. et al. Cultivation of a native alga for biomass and biofuel accumulation in coal bed methane production water. **Algal research**, v. 19, p. 63-68, 2016.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 42, p. 155-164, 2002.

JUNEAU, P.; HARRISON, P. J. Comparison by PAM Fluorometry of Photosynthetic Activity of Nine Marine Phytoplankton Grown Under Identical Conditions. **Photochemistry and photobiology**, v. 81, n. 3, p. 649-653, 2005.

KIM, Sunjin et al. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource technology**, v. 144, p. 8-13, 2013.

KIM, Sunjin; LEE, Yunhee; HWANG, Sun-Jin. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 511-516, 2013.

KRAUSE, G. Heinrich; JAHNS, Peter. Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. **Light-harvesting antennas in photosynthesis**, p. 373-399, 2003.

KUNERT, R. Processamento primário de petróleo. Recursos Humanos. Universidade Petrobras. **Escola de Ciências e Tecnologia E&P**, 2007.

LEONG, Yoong Kit; CHANG, Jo-Shu. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. **Bioresource technology**, v. 303, p. 122886, 2020.

LOMBARDI, Ana T.; MALDONADO, Maria T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v. 108, p. 77-87, 2011.

MOTTA, Albérico Ricardo Passos da et al. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, p. 15-26, 2013.

NASCIMENTO, Raphael Santos; ALVES, Geziele Mucio. Fontes alternativas e renováveis de energia no Brasil: Métodos e benefícios ambientais. **XX Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência—Universidade do Vale do Paraíba**, 2016.

NOVOVESKÁ, Lucie et al. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. **Marine drugs**, v. 17, n. 11, p. 640, 2019.

RAMAKRISHNAN, Balasubramanian et al. The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 699-821, 2010.

ROSINI, Edna Ferreira; SANT'ANNA, Célia Leite; TUCCI, Andréa. Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: levantamento florístico. **Hoehnea**, v. 40, p. 661-678, 2013.

SILVA, Jaqueline Carmo; ECHEVESTE, Pedro; LOMBARDI, Ana Teresa. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 57-63, 2018.

SPEIGHT, James G. **Handbook of petroleum refining**. CRC press, 2016.

STABLEIN, Michael J. et al. Microalgal photosynthetic inhibition and mixotrophic growth in Post Hydrothermal Liquefaction Wastewater (PHW). **Algal Research**, v. 60, p. 102548, 2021.

YOUNG, Robert E. Petroleum refining process control and real-time optimization. **IEEE Control Systems Magazine**, v. 26, n. 6, p. 73-83, 2006.

ZACHLEDER, Vilém; BIŠOVÁ, Kateřina; VÍTOVÁ, Milada. The cell cycle of microalgae. **The physiology of microalgae**, p. 3-46, 201.