



## CONTEÚDO LIPÍDICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE *CHLORELLA VULGARIS* CULTIVADA EM ÁGUA PRODUZIDA

Bianca Bomfim Andrade<sup>1</sup>; Lucas Guimarães Cardoso<sup>1</sup>; Saulo Nascimento Mata<sup>1</sup>,  
Jamila Sueira de Jesus Silva<sup>2</sup>, Paulo Fernando de Almeida<sup>3</sup>, Janice Izabel Druzian<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; Salvador/Bahia;  
andrade.biancabomfim@gmail.com

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/Bahia

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; Salvador/Bahia

<sup>4</sup> Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia; Salvador/Bahia

**Resumo:** Estima-se que 80 a 90% da água fornecida às refinarias de petróleo e plantas petroquímicas seja descartada como água residual. A biodegradação é um importante processo de biorremediação da água produzida. Neste trabalho, a microalga *Chlorella vulgaris* foi cultivada em meio contendo diferentes concentrações de água produzida, avaliando a sua potencialidade para aplicação em biocombustíveis através do perfil de ácidos graxos das biomassas. Foram realizadas 3 condições de cultivo (30%AP, 40%AP e 50%AP), sendo realizado a extração de lipídios, quantificação e identificação de ácidos graxos e cálculo teórico de biodiesel. O cultivo de *C. vulgaris* em meio contendo 40% de água produzida e 60% de meio BG-11 possibilitou o maior acúmulo de lipídios e ácidos graxos.

**Palavras-Chave:** Microalga; *Chlorella*; Lipídios; Ácidos graxos; Água produzida.

## LIPID CONTENT AND FATTY ACIDS PROFILE OF *CHLORELLA VULGARIS* CULTIVATED IN PRODUCED WATER

**Abstract:** 80 to 90% of the water supplied to oil refineries and petrochemical plants is estimated to be disposed of as wastewater. Biodegradation is an important process of bioremediation of produced water. In this work, *Chlorella vulgaris* was cultivated in medium containing different concentrations of produced water, evaluating its potentiality for application in biofuels through the fatty acid profile of biomass. Three cultivation conditions were performed (30% AP, 40% AP and 50% AP), lipid extraction, quantification and identification of fatty acids and theoretical calculation of biodiesel. The cultivation of *C. vulgaris* in medium containing 40% of produced water and 60% of BG-11 medium allowed the largest accumulation of lipids and fatty acids.

**Keywords:** Microalgae; *Chlorella*; Lipids; Fatty acids; Produced water.



## 1. INTRODUÇÃO

A água produzida consiste na água associada ao óleo durante o processo de extração do petróleo e pode ser resultante de dois processos: pela mistura do óleo do poço com a água do mar que se encontra ao redor deste ou pela injeção de água no campo de petróleo para levar o óleo profundo à superfície [1]. Estima-se que 80 a 90% da água fornecida às refinarias de petróleo e plantas petroquímicas seja descartada como água residual, uma vez que a água não entra no produto final [2]. Devido a sua composição complexa (matéria em suspensão e contaminantes orgânicos, como alcanos e compostos aromáticos), é necessário tratá-la antes de seu descarte. Um processo típico de tratamento de efluentes petroquímicos inclui neutralização, floculação, filtração, clarificação e biodegradação [3].

A biodegradação é um importante processo de biorremediação da água produzida. Os microrganismos são utilizados para consumir o óleo dissolvido restante e outros poluentes orgânicos. Mais de 200 espécies de microrganismos podem ser utilizados neste processo de biorremediação, dentre eles algas e cianobactérias [2]. *Chlorella vulgaris* é uma microalga unicelular que possui grande potencial para a biorremediação de diferentes águas residuais e produção de bioenergia devido ao seu alto teor de óleo, condição de cultivo mixotrófico (utiliza-se fonte de carbono orgânico dissolvida no meio de cultivo), alta taxa de crescimento sob várias condições adversas e tolerância a altos níveis de metais pesados [4].

Neste trabalho, a microalga *Chlorella vulgaris* foi cultivada em meio contendo diferentes concentrações de água produzida, avaliando a sua potencialidade para aplicação em biocombustíveis através do perfil de ácidos graxos das biomassas.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Água residual da indústria petroquímica

A água residual utilizada no estudo pertence a um poço de perfuração de petróleo existente na cidade de Santo Amaro (10° 47' 20" S e 37° 03' 16" W), localizada em Sergipe. O referido poço é um dos pontos de perfuração da empresa Petrobras.

### 2.2 Microalga e condições de cultivo

A cepa da microalga *Chlorella vulgaris* foi obtida do Banco de Microalgas Iracema Nascimento, do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). *C. vulgaris* foi cultivada em 3 diferentes condições combinando o meio padrão BG-11 [5] e a água produzida nas seguintes proporções: 30% água produzida e 70% meio BG-11 (AP30%); 40% água produzida e 60% meio BG-11 (AP40%); e 50% água produzida e 50% meio BG-11 (AP50%). Os experimentos foram realizados em triplicata e mantidos em fotobiorreator tipo Erlenmeyer, com volume de trabalho de 1 L e fotoperíodo 12 horas claro/escuro



durante 7 dias. A iluminação foi fornecida com lâmpadas tubulares fluorescentes tipo luz diurna de 40 W que produziam uma iluminação de  $41,6 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  [6]. A água evaporada foi reabastecida a cada dia, antes da amostragem, com água destilada estéril. A aeração foi realizada através de injeção de ar. Os meios de cultivo foram esterilizados antes da montagem dos experimentos.

## 2.3 Extração de lipídios e Composição de ácidos graxos

O teor lipídico total das biomassas foi extraído e quantificado seguindo metodologia descrita por Folch *et al.* (1957). [7]. A composição de ácidos graxos foi determinada através da transmetilação dos ácidos graxos com trifluoreto de boro hexano e identificação por cromatografia gasosa. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram separados e identificados em um cromatógrafo a gás (Clarus 680; Perkin Elmer®) com uma coluna DB-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm) equipado com um detector de ionização de chama. As injeções foram realizadas em duplicata para cada extração em um volume de 1  $\mu\text{L}$ . Os tempos de retenção dos FAME foram comparados com uma mistura de padrões conhecidos (C4-C24, 18, 919-AMP; Sigma-Aldrich®) para identificação destes. A quantificação dos ácidos graxos, expressa em concentração ( $\text{mg g}^{-1}$ ) porcentagem (%) de lipídios, foi realizada pela adição do padrão interno tricosanoato de metila (C23:0; Sigma Aldrich®) [8]. As áreas dos picos foram determinadas através do software Clarus Chromatography workstation para normalizar a porcentagem de áreas de ácidos graxos totais [9].

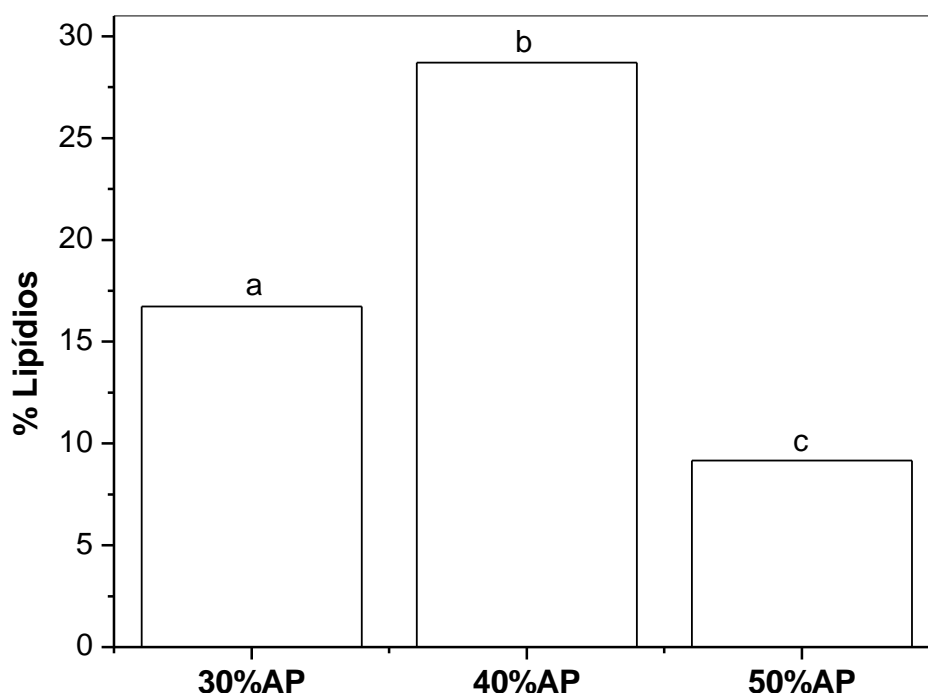
## 2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do programa STATISTICA 10.0, utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey a 95,0% de nível de confiança.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Conteúdo lipídico

A Figura 1 apresenta o conteúdo lipídico das biomassas cultivadas em 30%, 40% e 50% de água produzida, respectivamente. Houve diferença estatística entre as porcentagens de lipídios das biomassas, sendo o maior conteúdo lipídico (28,71%) observado em 40%AP e o menor em 50% AP (9,16%). O maior acúmulo de lipídios nas biomassas com menor quantidade de água produzida em relação ao meio BG-11 pode ser devido à maior concentração de nutrientes essenciais para o metabolismo celular fornecidos pelo meio padrão, bem como pela menor concentração dos componentes da água produzida, que podem inibir a síntese lipídica na célula [10].



**Figura 1.** Conteúdo lipídico das biomassas de *Chlorella vulgaris* obtidas após cultivo em meio contendo 30%, 40% e 50% de água produzida.

Apesar do pequeno número de estudos envolvendo o cultivo de microalgas em água produzida, é possível comparar os resultados do presente trabalho com outros realizados em águas residuais da indústria petroquímica. O conteúdo lipídico de *C. vulgaris* cultivada em 40%AP obtido neste trabalho foi superior ao da microalga *Tribonema* sp. cultivada em efluente do clarificador primário da indústria petroquímica [3]. Apesar de não. O cultivo de *C. vulgaris* na água produzida (AP40%) permitiu maior acúmulo de lipídios que *C. lobophora* cultivada em água residual urbana e agrícola eutrófica (17,84% e 20,40%, respectivamente) [11].

### 3.2 Composição de ácidos graxos

De acordo com a Tabela 1, o total de ácidos graxos presentes nas biomassas de *C. vulgaris* cultivada em meio contendo 30%, 40% e 50% de água produzida foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ), sendo a maior concentração de ácidos graxos encontrada na biomassa cultivada em 40% de água produzida ( $840,64 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e a menor na biomassa cultivada em meio com 50% de água produzida ( $465,37 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Do total de ácidos graxos encontrados na biomassa cultivada em 40% de água produzida, 79,41% corresponde a ácidos graxos monoinsaturados, principalmente C15:1 e C18:1 $\omega$ 9t.



**Tabela 1.** Composição de ácidos graxos da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em água produzida (30%, 40% e 50%).

Ácido graxo	mg g <sup>-1</sup>			%		
	30%AP	40%AP	50%AP	30%AP	40%AP	50%AP
4:0	ND	ND	135,27	ND	ND	18,02
6:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10:0	ND	1,05	1,37	0,60	0,13	0,76
11:0	4,58	5,82	ND	5,01	0,71	ND
12:0	37,68	2,54	ND	ND	0,31	ND
13:0	ND	3,04	ND	ND	0,37	ND
14:0	ND	ND	ND	0,81	ND	ND
14:1ω5	6,08	ND	ND	ND	ND	ND
15:1	ND	424,2	201,78	41,28	50,47	39,29
16:0	310,22	12,57	ND	1,04	1,49	ND
16:1ω7	7,74	15,87	ND	2,46	1,93	ND
17:0	18,46	13,6	ND	1,98	1,68	ND
18:0	14,97	13,32	ND	1,94	1,59	ND
18:1ω9t	14,61	227,88	ND	27,61	27,01	ND
18:2ω6c	207,62	38,59	17,09	2,40	4,57	2,28
18:2ω6t	18,12	ND	6,51	ND	ND	3,62
18:3ω6	ND	55,98	ND	6,57	6,67	ND
18:3ω3	49,37	26,18	72,38	5,50	3,08	24,94
20:3ω6	41,50	ND	ND	ND	ND	ND
22:2ω6	ND	ND	30,97	2,78	ND	11,09
Total	751,87 <sup>a</sup>	840,64 <sup>b</sup>	465,37 <sup>c</sup>	100,00	100,00	100,00
Saturados	85,66 <sup>a</sup>	51,94 <sup>b</sup>	136,64 <sup>c</sup>	11,38 <sup>a</sup>	6,28 <sup>b</sup>	18,78 <sup>c</sup>
Monoinsaturados	536,30 <sup>a</sup>	667,95 <sup>b</sup>	201,78 <sup>c</sup>	71,35 <sup>a</sup>	79,41 <sup>b</sup>	39,29 <sup>c</sup>
Poli-insaturados	129,91 <sup>a</sup>	120,75 <sup>b</sup>	126,95 <sup>c</sup>	17,25 <sup>a</sup>	14,32 <sup>b</sup>	41,93 <sup>c</sup>

Letras iguais na mesma linha para mg g<sup>-1</sup> e % indicam que não há diferença significativa entre os experimentos a 95% de confiança.

O aumento dos ácidos graxos monoinsaturados pode ser devido a atividade da enzima fosfolipídio diacilglicerol aciltransferase (PDAT) numa via enzimática independente de acil-CoA, capaz de mediar a renovação dos lipídios da membrana e promover a síntese de triacilgliceróis (TAG) sob estresse. Além de funcionar como forma de armazenamento de carbono e energia, o TAG pode atuar na proteção celular, impedindo que as microalgas danifiquem a oxidação sob condições de estresse [12].

A água produzida contém uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, sendo os constituintes principais: sais, sólidos dissolvidos totais, óleo, graxa, hidrocarbonetos poliaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, fenóis, ácidos orgânicos, compostos naturais orgânicos e inorgânicos, e aditivos químicos (biocidas e inibidores de corrosão) [1]. Desse modo, o cultivo em água produzida





expõe a microalga a uma condição de limitação de nutrientes, dentre eles o nitrogênio, um dos principais nutrientes para a produção de biomassa algal.

As quantidades de C18:1 obtidas no presente estudo foram superiores às encontradas por Chi *et al.* (2019) [13] (17,21%) na biomassa de *Chlorella* sp. cultivada em fotobiorreator de 250 mL em meio padrão. Zhu *et al.* (2015) [12] também observaram o aumento da porcentagem de C18:1 na biomassa de *Chlorella zofingiensis* cultivada sob limitação de nitrogênio (31,96%) quando comparada à porcentagem do controle (20,30%).

Os ácidos graxos monoinsaturados foram encontrados em maior quantidade também na biomassa cultivada em 30% de água produzida (536,30 mg g<sup>-1</sup>). Diferentemente, a biomassa cultivada em meio com 50% de água produzida apresentou maior quantidade de poli-insaturados, como C18:3 $\omega$ 3 (24,94%). Ördög *et al.* (2016) [14] também encontraram predominância do ácido  $\alpha$ -linoleico na biomassa de três cepas de *Chlorella* (*Chlorella* sp. MACC-438, *Chlorella minutissima* MACC-452 e *Chlorella* sp. MACC-728), porém em quantidades menores que no presente estudo (9,0%, 10,8% e 9,0%, respectivamente).

#### 4. CONCLUSÃO

O cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio contendo 40% de água produzida e 60% de meio BG-11 possibilitou o maior acúmulo de lipídios e ácidos graxos, os quais podem ser convertidos em biodiesel.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal da Bahia (UFBA) e a FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) - Brasil, projeto CNPq, MCTIC (Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações) - Brasil.

#### 5. REFERÊNCIAS

<sup>1</sup> AL-GHOUTI, M. A.; AL-KAABI, M. A.; ASHFAQ, M. Y.; DA'NA, D. A. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 222-239, 2019.

<sup>2</sup> JAFARINEJAD, S., & JIANG, S. C. Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, 2019.

<sup>3</sup> HUO, S.; CHEN, J.; ZHU, F.; ZOU, B.; CHEN, X.; BASHEER, S.; CUI, F.; QIAN, J. Filamentous microalgae *Tribonema* sp. cultivation in the anaerobic/oxic effluents of



petrochemical wastewater for evaluating the efficiency of recycling and treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 145, p. 27-32, 2019.

<sup>4</sup> ZNAD, H.; AL KETIFE, A.M.D.; JUDD, S.; ALMOMANI, F.; VUTHALURU, H.B. Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Ecological Engineering**, v. 110, p. 1-7, 2018.

<sup>5</sup> RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R.G. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

<sup>6</sup> MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Carbon dioxide mitigation with *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007.

<sup>7</sup> FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

<sup>8</sup> JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, I.L.; FERREIRA, E.S.; DRUZIAN, J.I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

<sup>9</sup> NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A.; SOUZA, C. O.; DRUZIAN, J. I.; HUSSAIN, J.; LIAO, W. Microalgae Versus Land Crops as Feedstock for Biodiesel: Productivity, Quality and Standard Compliance. **Bioenergy Resource**, v. 7, p. 1002-1013, 2014.

<sup>10</sup> GAO, F.; YANG, H.; LI, C.; PENG, Y.; LU, M.; JIN, W.; BAO, J.; GUO, Y. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 118-124, 2019.

<sup>11</sup> KUMAR, K.S.; PRASANTHUMAR, S.; RAY, J.G. Biomass yield, oil productivity and fatty acid profile of *Chlorella lobophora* cultivated in diverse eutrophic wastewaters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 338-344, 2017.

<sup>12</sup> ZHU, S.; WANG, Y.; SHANG, C.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, p. 205-209, 2015.

<sup>13</sup> CHI, N.T.L.; DUC, P.A.; MATHIMANI, T.; PUGAZHENDHI, A. Evaluating the potential of green alga *Chlorella* sp. for high biomass and lipid production in biodiesel viewpoint. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 184-188, 2019.

<sup>14</sup> ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; AREMU, A. O.; OKEM, A.; LOVÁSZ, C.; MOLNÁR, Z.; VAN STADEN, J. Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. **Algal Research**, v. 16, p. 141-149, 2016.