



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



FLÁVIA COSTA OLIVEIRA

OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA EXTRAÇÃO LIPÍDICA
UTILIZANDO ESTIRPES DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

Uberlândia
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



FLÁVIA COSTA OLIVEIRA

OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA EXTRAÇÃO LIPÍDICA
UTILIZANDO ESTIRPES DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia em Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista

Uberlândia
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 Oliveira, Flávia Costa, 1987-
2019 OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA EXTRAÇÃO
LIPÍDICA UTILIZANDO ESTIRPES DA MICROALGA *Scenedesmus sp.*
[recurso eletrônico] / Flávia Costa Oliveira. - 2019.

Orientador: Antônio Carlos Ferreira Batista.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Biocombustíveis.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2438>
Inclui bibliografia.

1. Biocombustível. I. Carlos Ferreira Batista, Antônio, 1973-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Biocombustíveis. III. Título.

CDU: 662.756

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 35, PPBIC				
Data:	11 de Setembro de 2019	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	15:52
Matrícula do Discente:	11712PGB003				
Nome do Discente:	Flávia Costa Oliveira				
Título do Trabalho:	Otimização de produção de biomassa para extração lipídica utilizando estirpes da microalga <i>Scenedesmus sp.</i>				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Biomassas energéticas: ciência e tecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se no Auditório 2, Campus do Pontal, da Universidade Federal de Uberlândia, em Ituiutaba-MG, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta: Professores Doutores: Wesley da Silva Borges, do Instituto Luterano de Ensino Superior; Anizio Marcio de Faria, da Universidade Federal de Uberlândia; e Antônio Carlos Ferreira Batista, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Antônio Carlos Ferreira Batista, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos,

conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Ferreira Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/09/2019, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anizio Marcio De Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/09/2019, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wesley da Silva Borges, Usuário Externo**, em 11/09/2019, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1490772** e o código CRC **583C2E9F**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Roseli Costa Oliveira e Edmilson José Oliveira, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

Obrigada por me apresentarem a importância da família e o caminho da persistência.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Antônio Carlos Ferreira Batista (Flash), o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de pessoas que tanto contribuíram para meu crescimento. Meu muito obrigado por toda compreensão e apoio com as traduções, pelos ensinamentos e desprendimento em ajudar-nos, meu respeito e admiração por todos os conselhos e disponibilidade.

Ao professor Wesley da Silva Borges por todo apoio na construção desse projeto, obrigado pela disponibilidade em ensinar, pela receptividade de ideias, compartilhamento de conhecimento, disponibilização de alguns materiais e ambiente para testes e pesquisas iniciais. Minha gratidão por todo incentivo e contribuições que o fizeram possível a execução dessa dissertação.

À todos os professores do PGB-UFU que fizeram parte da construção do meu conhecimento. Em especial, ao professor Guimes Rodrigues Filho, precursor desse aprendizado, que exemplifica a ética e competência profissional, obrigado pelo incentivo e oportunidade de convívio.

A professora Rosana Maria Nascimento de Assunção pelo incentivo e grande ajuda com o fornecimento de material e equipamentos para a realização deste trabalho.

Ao professor, Anízio Marcio de Faria, minha admiração pela solicitude, prontidão e suporte estatístico, gratidão pelas relações construídas. Meu muito obrigado!

Aos amigos da iniciação científica do curso de Química, em particular a Isabela de Souza Dias, obrigada pelos momentos de pesquisa no CT-Infra; pela parceria com as análises, paciência e pro atividade.

Em especial ao amigo Witter Duarte Guerra, meu muito obrigada, compartilhamos medos, inseguranças, caminhamos passo a passo juntos, incentivando e apoiando o crescimento mutuo, obrigada pela prontidão e boa vontade de sempre em me ajudar a resolver meus problemas, minhas conquistas também são suas.

A amiga Jaqueline Elise Garcia Chiesa, gratidão pelos conselhos, pelo incentivo, por toda contribuição ao longo das pesquisas.

A Andressa Tironi, pela motivação, apoio e disponibilidade em nos auxiliar quando necessário, sempre positiva e calma, nos transmitia segurança e persistência.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

- Albert Einstein

RESUMO

Espécies de microalgas como a *Scenedesmus* sp. têm alto potencial de acumulação lipídica em suas células, o que viabiliza estudos voltados a exploração desses organismos como matéria prima para a produção de biodiesel. Entre as variáveis que podem interferir no cultivo, os fatores biológicos, físicos e químicos influenciam diretamente no armazenamento metabólico das reservas nutricionais da microalga. Ao se desenvolver um meio de cultura otimizado para produção de bio-óleo extraído de microalgas é importante investigar metodologias que potencializem os sistemas de cultivo e colheita de biomassa. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar técnicas de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. que possibilite uma maior produção de bio-óleo. O cultivo ocorreu em reatores planos horizontais em acrílico, mantidos em temperatura ambiente a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com controlador de fotoperíodo em 12 horas de luz e 12 horas de escuro, utilizando três lâmpadas fluorescentes brancas de 40 Volts. O meio de cultivo, o tempo e a porcentagem de inóculo foram as variáveis otimizadas para o crescimento das algas e rendimento lipídico. Neste sentido e visando minimizar o número de experimentos realizados e o tempo gasto utilizou-se o planejamento fatorial 2^3 e o planejamento composto central. As análises indicaram que a metodologia experimental para o cultivo de microalga *Scenedesmus* sp., apresentou melhores rendimentos no teor lipídico, quando submetidos ao cultivo em meio Chu com 20% de inóculo inicial. No entanto, observa-se que o acúmulo de lipídeos atinge um valor máximo quando a concentração inicial de meio Chu é de aproximadamente 39,5%. Verificou-se ainda que a quantidade de dias (tempo) apresentou um ponto de máximo, indicando a tendência de maior acúmulo de lipídeos em 20 dias de cultivo. Para essas condições de concentração inicial de meio Chu (39,5%) e tempo de cultivo (20 dias), o modelo prevê um acúmulo de teor lipídico de aproximadamente 9,74%.

Palavras-chave: Biodiesel, microalgas; *Scenedesmus*; lipídeos.

ABSTRACT

Species of microalgae such as *Scenedesmus* sp. have high potential for lipid accumulation in their cells, which makes feasible studies aimed at the exploitation of these organisms as raw material for the production of biodiesel. Among the variables that may interfere with the cultivation, diverse factors directly influence the metabolic storage of microalga nutritional reserves. When developing an optimized culture medium for the production of bio-oil extracted from microalgae it is important to investigate methodologies that increase biomass cropping and harvesting systems. This study was developed looking for evaluating which techniques of the microalgae *Scenedesmus* sp. allows a greater production of bio-oil. The cultivation took place in horizontal flat acrylic reactors, kept at room temperature to $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, with photoperiod controller in 12 hours of light and 12 hours of darkness, using three white fluorescent lamps of 40 Volts. The culture medium, time and inoculum percentage were the variables optimized for algal growth and lipid yield, in order to minimize the number of experiments performed and the time spent using factorial design 2^3 and central composite desing. The analyzes indicated that the experimental methodology for cultivation of microalgae *Scenedesmus* sp., Presented better yields in the lipid content, when submitted to cultivation in Chu medium with 20% of initial inoculum. However, it is observed that lipid accumulation reaches a maximum value when the initial concentration of Chu medium is approximately 39.5%. It was also verified that the number of days (time) presented a maximum point, indicating the tendency of higher lipid accumulation in 20 days of cultivation. For these conditions of initial concentration of Chu medium (39.5%) and cultivation time (20 days), the model predicts an accumulation of lipid content of approximately 9.74%.

Keywords: Biodiesel, microalgae, *Scenedesmus*., lipids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação dos Biocombustíveis	18
Figura 2 - Classificação do Biodiesel.....	19
Figura 3 - Microalga do gênero <i>Scenedesmus</i>	22
Figura 4 - Esquema metabólico das microalgas	23
Figura 5- Mercado para produtos derivados de algas	26
Figura 6 - Visão superior esquemático de um tanque raceway pond (A). Cultivo de microalgas em lagoa circular(B).....	27
Figura 7- Representação de uma curva de crescimento de microalgas em regime de batelada.	33
Figura 8- Biorrefinaria de Microalgas	34
Figura 9- Perfil das microalgas como fonte de energias renováveis	34
Figura 10- Condições operacionais para o cultivo de <i>Scenedesmus</i>	38
Figura 11 - Processo de colheita e secagem de biomassa da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	40
Figura 12 - Extração de óleo da <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando, cadrinho, banho ultrassônico e centrífuga.	40
Figura 13- Processo representativo do sistema de extração de óleo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. utilizando, funil de separação, filtragem com sulfato de sódio anidro e capela de exaustão.	41
Figura 14 - Crescimento celular analisado nos ensaios experimentais.	44
Figura 15- Gráfico normal de efeitos para o cultivo das algas. Sendo que 1 corresponde ao meio de cultivo, 2 ao tempo de cultivo e 3 à porcentagem de inóculo.	47
Figura 16 - Superfície de resposta sendo influêncida pela variação de porcentagem nutricional em Meio Chu e tempo em dias	54

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1- Teor lipídico encontrado em diferentes espécies da microalga <i>Scenedesmus</i>.....</u>	20
<u>Tabela 2- Perfil das microalgas como fonte de biocombustível.....</u>	20
<u>Tabela 3 - Comparação do teor de óleo, produtividade de óleo, área de produção e produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais com microalgas.</u>	21
<u>Tabela 4 - Composição de aminoácidos encontrada nas espécies de microalgas <i>Scenedesmus</i>.</u>	24
<u>Tabela 5 - Composição de Proteínas, Carboidratos e Lipídeos de microalgas.....</u>	25
<u>Tabela 6 - Meio de Cultivo Chu</u>	37
<u>Tabela 7 - Meio de cultivo Guillard modificado sem adição de vitaminas</u>	37
<u>Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 para variações no meio de Cultivo.</u> Variáveis: M: Meio de Cultivo, T: Tempo de cultivo em dias e I: Porcentagem de Inóculo..	39
<u>Tabela 9 - Variáveis e níveis da otimização do teor lipídico</u>	42
<u>Tabela 10 - Matriz de planejamento composto central em 2 variáveis para otimização do teor lipídico (1- Concentração Meio Chu em porcentagem (%) e 2 - Tempo em dias).....</u>	43
<u>Tabela 11 - Matriz do planejamento de experimentos com resultados do teor lipídico obtido das algas de acordo com o planejamento fatorial 2^3</u>	46
<u>Tabela 12 - Efeitos das variáveis estudadas e suas interações na porcentagem de lipídeos obtidas no cultivo da microalga</u>	46
<u>Tabela 13 - Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e Teor Lipídico das microalgas <i>Scenedesmus</i> sp.</u>	49
<u>Tabela 14 – Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e Teor Lipídico das microalgas <i>Scenedesmus</i> sp. em processo de otimização de cultivo</u>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

SCN - *Scenedesmus*

FBR – Fotobiorreator

% – Porcentagem

CO₂ – Dióxido de Carbono

PI – Percentual de inóculo

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

MJ – Megajoules

Kg – Quilograma

ha – hectare

cél – Células

g – Grama

EMPRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

pH – potencial hidrogeniônico

°C – Graus Celsius

nm – nanômetros L – Litro

mL – Mililitros

rpm – Rotação por minuto

KHz – quilohertz

W - Watt

ABS – Valor da leitura em absorbância

PF – Planejamento Fatorial

PCC – Planejamento composto central

M – Meio de Cultivo

T – Tempo de cultivo

I – Porcentagem de Inóculo

T.L – Teor de Lipídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
4.1	BIOCOMBUSTÍVEIS.....	17
4.1.1	Biodiesel	18
4.1.2	Biodiesel a partir do óleo de microalgas.....	19
4.2	CLASSIFICAÇÃO DAS MICROALGAS	21
4.2.1	Microalga <i>Scenedesmus</i>	22
4.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS	22
4.3.1	Carboidratos.....	23
4.3.2	Proteínas.....	23
4.3.3	Lipídeos	24
4.4	MERCADO PARA PRODUTOS DERIVADOS DE MICROALGAS	25
4.5	CULTIVO DE MICROALGAS	26
4.5.1	Temperatura	27
4.5.2	Sistema aberto.....	27
4.5.3	Sistema Fechado	28
4.6	CONDIÇÕES DE CULTIVO QUE AFETAM O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS DAS MICROALGAS.....	30
4.6.1	Intensidade Luminosa	30
4.6.2	Aeração e pH	30
4.6.3	Concentração de Inóculo	31
4.6.4	Tempo de cultivo	31
4.6.5	Necessidades nutricionais das microalgas	32
4.7	Fases de crescimento das microalgas	32
4.8	MICROALGAS E A BIOTECNOLOGIA.....	33
4.9	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	35
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
5.1	OBTENÇÃO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.....	36
5.1.1	Meios de Cultivo.....	36
5.1.2	Condições de produção	38
5.1.3	Crescimento celular e biomassa seca produzida	39
5.2	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS	40
5.3	ESTIMATIVA DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO	42

6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
6.1	AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp. EM CULTIVOS COM MEIO CHU E GUILLARD.....	44
6.2	ENSAIOS REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO NO CULTIVO DE MICROALGAS	455
6.3	AVALIAÇÃO GERAL DE BIOMASSA SECA E TEOR LIPÍDICO PRODUZIDO 488	
6.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO	522
7	CONCLUSÕES	567
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Uma opção significativa para a produção de biodiesel, é a exploração de outros organismos fotossintéticos, em que se destacam as microalgas como alternativa verde e renovável, e têm-se estabelecido como matéria prima promissora, capazes de acumular alto teor lipídico, gerando uma nova extensão nas indústrias de energias (SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019).

Protistas, as microalgas constituem um grupo bem heterogêneo de espécies fotossintéticas, capazes de produzir proteínas, hidrocarbonetos, polissacarídeos e lipídeos empregados como fonte de energia potencial aos biocombustíveis (SVENNING *et al.*, 2019).

Segundo Costa (2018) o meio de cultivo ideal para produção de energia via microalgas, refere-se a um processo cuidadosamente direcionado a cada espécie em questão, para que os resultados de adaptação e retorno de nutrientes sejam satisfatórios, apresentando um perfil socioeconômico rentável.

Contudo é importante analisar a viabilidade de produção do biodiesel perante ao rendimento de óleo por espécies. No que concerne às microalgas, podem chegar a um potencial lipídico de até 70%. Nesta perspectiva, Ocamoto *et al.* (2018) relata em seus estudos que a quantidade de óleo presentes nas cadeias produtivas agrícolas, variam cerca de 47% no óleo de mamona, ao passo que, nos grãos, a quantidade de óleo concentra-se em torno de 40% na semente de girassol, 18% na soja e 44% no milho.

Dessa forma, as microalgas são oportunas à produtividade do biodiesel, apresentando alto rendimento em óleo, crescimento em curto espaço de tempo, otimizadas em uma temperatura de 20°C à 35°C, oportunizando a não competição e auxiliando na captura e uso de CO₂ (ESPINOSA *et al.*, 2014).

O cultivo de microalgas em ambientes naturais como as lagoas abertas, ou artificiais com auxílio de fotobiorreatores (FBR) são constantemente utilizados. Porém, apesar da empregabilidade econômica no uso de lagoas abertas, os FBR são considerados mais favoráveis devido a não exploração do solo, menor gasto de água, controle das variáveis climáticas além de minimizar as probabilidades de contaminação (MARIANO, 2011; XU *et al.*, 2019).

De acordo com Guldhe *et al.*, (2014) o fornecimento de nutrientes advindos da água são limitados como meio de crescimento de biomassa, e consequentemente poderiam desencadear um aumento nos gastos com a produção, pois exigem essencialmente fontes nutritivas compostas por macro e micronutrientes (EL SHIMI; MOUSTAFA, 2017).

Para que conversão da biomassa em biodiesel seja economicamente viável, Bibi *et al.*, (2016) contextualizam a importância de ampliar sua produtividade e minimizar os custos com os insumos utilizados para preparar o meio de cultivo sintético, pois totalizam um gasto de aproximadamente 35% do valor total da produção.

Vale ressaltar também a importância de promover as vantagens ambientais, pois o cultivo desses organismos não necessita competir por terras agricultáveis, possuem alta capacidade de capturar CO₂ minimizando os danos causados pelo efeito estufa na atmosfera e ainda, as microalgas despertam grande potencial por não serem tendenciosas a causar problemas como desmatamento, erosão do solo e poluição da água quando comparadas a outras fontes de matéria prima para produção de biocombustíveis (SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019; SHUBA; KIFLE, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A principal justificativa deste trabalho se fundamenta no fato que, atualmente, há a necessidade em substituir os combustíveis fósseis, que são limitados, por outros que são renováveis, conforme Simionato *et al.* (2013). A geração de novos combustíveis, como por exemplo o biodiesel poderá ser feita em um futuro com a utilização de microalgas, pois segundo Yadala e Cremaschi (2014), elas podem possuir alta concentração lipídica que pode ser utilizada para produção de biocombustível.

O melhoramento das condições de crescimento de microalgas para maximizar a produção de biomassa em termos de densidade celular das algas e concentração lipídica também é uma forte justificativa para a realização deste trabalho, pois melhorando estas condições é possível aumentar o potencial de utilização desta espécie para produção de biocombustíveis (ESPINOSA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

Otimizar o cultivo de uma espécie de *Scenedesmus* sp. que possibilite uma maior produção de teor lipídico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

I - Verificar o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. quando cultivadas em diferentes porcentuais de inóculo (PI) no meio de cultivo;

II - Testar o crescimento da microalga em diferentes meios de cultivo para selecionar qual meio nutricional, Chu ou Guillard, a microalga melhor se adapta visando a produção de teor lipídico;

III - Otimizar variáveis que afetam a produção lipídica pelas microalgas, empregando um planejamento experimental.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

A busca por substituir os combustíveis fósseis pode promover transformações significativas para a economia, minimizando problemas como, altas cotações do barril de óleo cru, as grandes crises do petróleo, redução dos estoques internacionais, previsão de esgotamento das reservas do produto para o futuro e questões de viés político e ambiental, assim aumentando a competitividade por biocombustíveis, fomentando o crescimento regional e o desenvolvimento do país, com maior demanda de mão de obra, minimizando a desigualdade social e contribuindo com a sustentabilidade do ecossistema (SILVA, 2019; SILVA *et al.*, 2014).

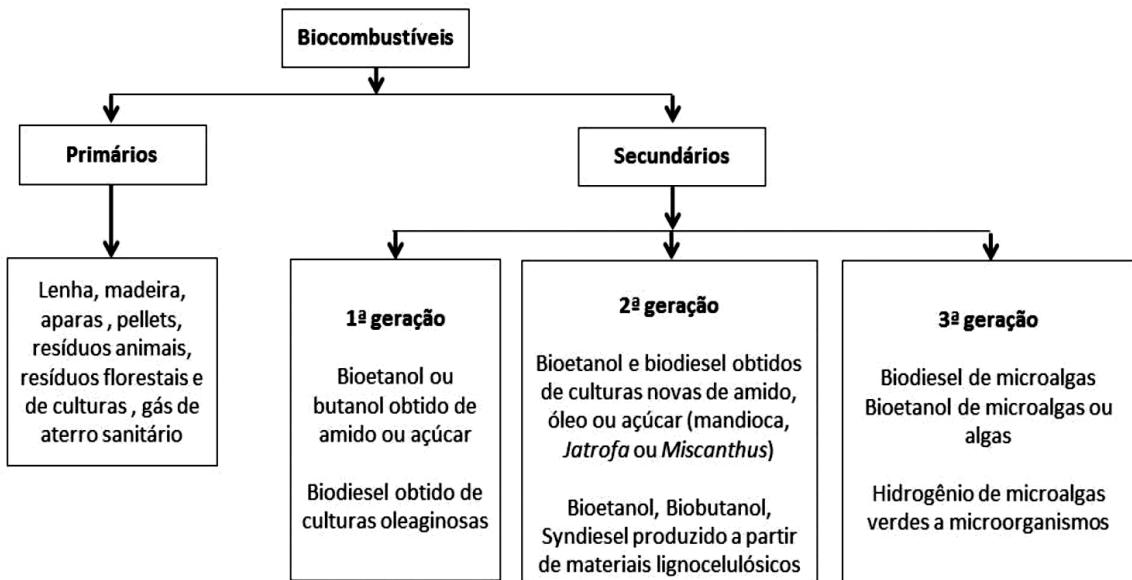
Tecnicamente, os biocombustíveis são definidos de acordo com a Lei Federal nº 9.478, de 06 de agosto de 1997, como “(...) todo combustível derivado de biomassa renovável, tal como biodiesel e etanol, para uso em motores de combustão interna; ou, conforme regulamento da Agência Nacional de Petróleo, Biocombustíveis e Gás Natural (ANP), para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (ANP, 2019).

Entre os vegetais mais comumente empregados na fabricação de biocombustíveis, principalmente no Brasil, estão a cana-de-açúcar, soja, milho, arroz, a mamona, a palma, o girassol, o babaçu, a canola e outros. Essas fontes são consideradas limpas e renováveis e estão abundantemente disponíveis na natureza. A partir delas é possível produzir combustíveis, como, etanol, biogás e o biodiesel (LOPES; MARTINS, 2019).

A produção desses biocombustíveis está bastante consolidada no Brasil, um dos maiores exportadores de álcool e suas tecnologias e um dos maiores produtores mundiais de biodiesel, junto dos Estados Unidos da América (EUA) e da União Europeia (SALOMÃO, 2013).

Na atual conjuntura, os biocombustíveis como geração de energia, dividem-se em primários e secundários. Os primários podem ser analisados a partir do aquecimento, cozimento ou geração elétrica, como o exemplo da lenha; já os secundários, abordam características específicas que acarretam considerações diferentes quanto aos tipos de processamento de biomassa, matéria prima e condição de desenvolvimento para obter como produto final o bioetanol e o biodiesel, sendo assim subdivididos em três “gerações” conforme Figura 1 (TOMAS, 2016).

Figura 1- Classificação dos Biocombustíveis



Fonte: Adaptado de Tomas (2016)

4.1.1 Biodiesel

O biodiesel foi inserido como fonte de energia no Brasil no ano de 2005, pela Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005, por meio de sua adição ao diesel mineral consumido no país; e em virtude ao desenvolvimento sustentável, técnico e econômico ele foi sugerido pelo Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) com intuito de programar uma cadeia produtiva de biodiesel no país por meio de processos biotecnológicos potencializados em biomassa, aumentando a diversificação das oleaginosas utilizadas em sua produção inseridas à agricultura familiar (PEDROTI, 2013).

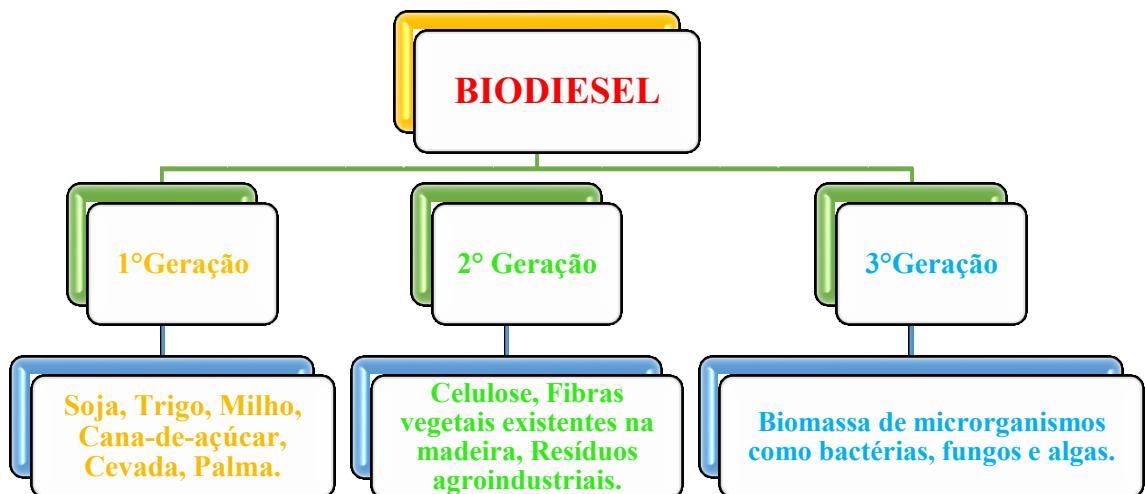
Com suas características de densidade semelhantes ao diesel de petróleo, o biodiesel é um biocombustível geralmente constituído por ésteres de ácido graxo, derivados a partir de óleos orgânicos, extraídos através da metodologia de transesterificação (BATISTA *et al.*, 2013; TAHER, 2013).

Aspectos benéficos são apresentados pela empregabilidade do biodiesel como fonte energética, entre eles destaca-se a isenção de emissão de poluentes, como o enxofre e os gases sulfídricos contribuindo para minimizar os problemas respiratórios e cancerígenos recorrentes na sociedade com a queima de combustível fóssil (BATISTA *et al.*, 2014; DE BHOWMICK *et al.*, 2014).

O biodiesel é subdividido em três gerações, onde a primeira abrange espécies vegetais da agricultura, a segunda geração compreende materiais lignocelulósicos e já terceira geração

se destaca espécies não comestíveis como pode ser visualizado na Figura 02 (PENA *et al.*, 2017).

Figura 2- Classificação do Biodiesel



Fonte: Adaptado de Pena *et al.*, (2017)

A soja representa a cultura mais expressiva dentre as aquisições de biomassa, só perdendo em volume de produção para a cana-de-açúcar, porém acredita-se que ela não deva permanecer como matéria prima predominante na fabricação de biodiesel, por apresentar menor rendimento de óleo por área cultivada e alto custo de produtividade, acima do próprio diesel, reduzindo portanto sua competitividade, provocando um descompasso entre oferta e demanda (BRAGA; BRAGA, 2012).

4.1.2 Biodiesel a partir do óleo de microalgas

Estudos apontam que as algas verdes unicelulares são as mais indicadas para conversão de biomassa em biodiesel, com potencial lipídico e alta densidade de biomassa são consideradas excelentes matérias primas para produção, o valor de aquecimento do biodiesel derivado de microalgas, possui um rendimento de 41 MJ / kg, próximo ao diesel de petróleo que é de 42,7 MJ / kg, tornando-o uma alternativa viável (QIN; WU, 2019).

Cada espécie de microalga apresenta diferentes porcentagens de lipídeos no interior de suas células. A *Scenedesmus* por exemplo apresenta de 19,6 a 21,1% de lipídeos em suas células enquanto a *Scenedesmus rubescens* pode chegar a valores superiores a 70% (Tabela 1) (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

*Tabela 1 - Teor lipídico encontrado em diferentes espécies da microalga *Scenedesmus*.*
 Fonte: Adaptado de Oliveira et al., (2014)

Microalga	Lipídeos %
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12 – 14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 – 18,4
<i>Scenedesmus sp.</i>	21,1 – 43
<i>Scenedesmus sp. DM</i>	21,1
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 – 40
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	12
<i>Scenedesmus rubescens</i>	73

Sob este aspecto, o biodiesel a partir de microalgas apresenta características favoráveis e promissoras, onde Pena *et al.* (2017) destaca vantagens como a não competição com a agricultura, o menor consumo de água e a reutilização de águas residuais, condições de adaptação variáveis, produção contínua e crescimento rápido, não necessitam de insumos para combate de pragas, competentes fixadoras de carbono atmosférico, contribuindo assim para minimizar a emissão de gases do efeito estufa. A Tabela 2 resume algumas das principais vantagens e apresenta um perfil com as desvantagens mediante a produção de biodiesel proveniente de microalgas.

Tabela 2 - Perfil das microalgas como fonte de biocombustível
 Fonte: Adaptado de Fontoura (2017)

Vantagens	Desvantagens
Elevada taxa de crescimento das microalgas;	Baixa concentração de microalgas na água da cultura;
Menor necessidade de água que as outras culturas vegetais terrestres;	Elevado custo de capital inicial;
Menor ocupação de terrenos;	Adição de nutrientes potencialmente contaminantes;
Possibilidade de desenvolvimento em água doce, salgada ou salobra;	Custos de manutenção dos equipamentos elevados;
Utilização de águas residuais urbanas ou industriais como fonte de nutrientes;	Dificuldades técnicas na etapa de recolha da biomassa;
Custo mais efetivo de cultivo;	Dificuldade de controle das condições de cultivo quando em larga escala;
Possibilidade de obter elevadas concentrações de biomassa e conteúdo oleico em condições ideais de cultivo;	Elevada utilização de solventes na etapa de extração e transesterificação;
Elevada eficiência na redução de CO ₂ ;	Elevado dispêndio energético em todas as fases de processamento

Embora as microalgas apresentem uma porcentagem lipídica inferior às demais matérias primas, seu rendimento de óleo pode atingir uma importância significativa diante da alta produtividade (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação do teor de óleo, produtividade de óleo, área de produção e produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais com microalgas.

Fonte: Adaptado de Erazo (2017)

Matéria Prima	Teor de óleo (%)	Produtividade de óleo (g)	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	1190	12	862
girassol	40	1070	11	946
mamona	48	1307	9	1156
palma	36	5366	2	4747
Microalgas	20	58700	0,2	51927
	50	96800	0,1	86515
	70	136900	0,1	121104

4.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MICROALGAS

As microalgas são organismos eucariontes, podem ser unicelulares ou pluricelulares e vivem em água doce ou salgada. Se reproduzem basicamente de forma assexuada, por divisão binária. São seres produtores dentro da cadeia alimentar, fazem fotossíntese e sintetizam matéria orgânica (KLEIN, 2015).

Silva (2015) aborda um contexto em que o Reino Protista engloba seres unicelulares eucariontes como os protozoários e as algas unicelulares e pluricelulares, porém a partir de novos estudos moleculares, constatou-se que as algas verdes estariam mais próximas filogeneticamente das plantas (talófitas) do que protistas, e assim determinaram a distinção de dois grandes grupos: os protozoários e as algas (grupo sem valor taxonômico).

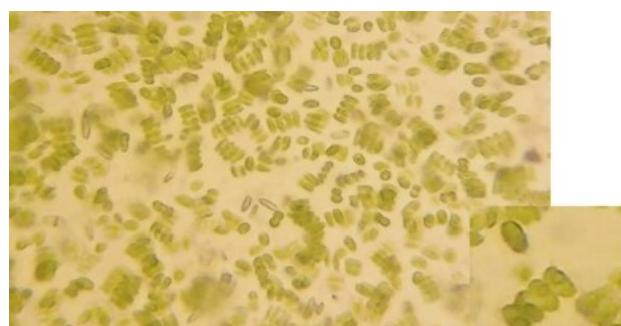
As algas são estudadas em uma divisão de seis classes, em que estão relacionados os grupos das Euglenófitas, as Bacilariófitas (Diatomáceas), as Dinoflageladas, Algas pardas ou feofíceas, Algas verdes ou clorofíceas e as Algas vermelhas ou rodofíceas (BORGES, 2014).

4.2.1 Microalga *Scenedesmus*

O gênero *Scenedesmus* é uma microalga eucariótica, pertencente ao grupo das algas verdes, encontradas em ecossistemas de água doce. Sem valor taxonômico, fazem parte da família *Scenedesmaceae*, ordem *Chlorococcales* e classe *Chlorophyceae* (SANT'ANNA *et al.*, 2012).

São seres clorofilados, geralmente unicelulares, se agrupam em colônias com propagação estritamente assexuada por autoesporulação, formadas em geral com 2, 4, 8 ou até 16 células (células) (Figura 3) que produzem um número geneticamente fixo de células, conhecido como cenóbio (COUGO, 2017).

Figura 3 – Microalga do gênero *Scenedesmus*



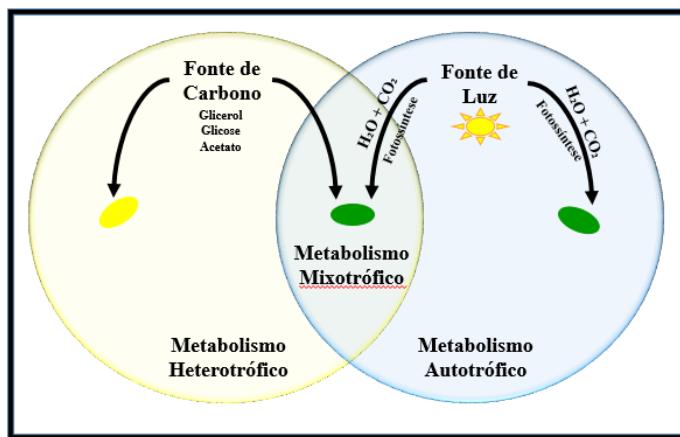
Fonte: Cougo (2017)

De fácil cultivo, a microalga *Scenedesmus* tem despertado crescente interesse na demanda tecnológica limpa e sustentável, sendo direcionada a linhas de pesquisa que desenvolvam metodologias para potencializar seu crescimento e adaptação ao meio de cultivo (BENEDITO; PORTO; FREITAS, 2019).

4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS MICROALGAS

A composição celular das microalgas é ajustada conforme os processos metabólicos (Figura 4), podendo ser classificadas como autotróficas durante a conversão de compostos inorgânicos e energia luminosa em carbono orgânico; heterotróficos, quando os nutrientes são favorecidos na ausência de luz e mixotróficos quando ambos os metabolismos ocorrem (SILVA, 2014).

Figura 4 - Esquema metabólico das microalgas.



Fonte: Adaptado de Silva (2014)

O processo de fotossíntese fornece estrutura para formação de moléculas mais complexas por meio da biossíntese, como carboidratos, proteínas e lipídeos (COUGO, 2017).

4.3.1 Carboidratos

Também chamados de glicídios, os carboidratos podem ser classificados em monossacarídeos (*monos*, único; *sácharon*, açúcar), dissacarídeos e polissacarídeos. A glicose é um carboidrato monossacarídeo, muito utilizada pelos seres vivos como fonte de energia, produzida por meio da fotossíntese. Além de desempenhar papel importante como fonte de energia, os glicídios também atuam na formação estrutural dos seres vivos, presentes na membrana plasmática, participam do revestimento celular. É considerado um composto presente nas microalgas de alto valor agregado, devido a sua potencial aplicação terapêutica, nutricional, cosmética, têxtil, energética, entre outras (BORGES, 2014).

4.3.2 Proteínas

Presentes na grande maioria dos processos biológicos, as proteínas, sintetizadas a partir da união de moléculas menores, de aminoácidos, são as moléculas orgânicas em maior concentração presentes nas células das microalgas, compreendem aproximadamente 50% do seu peso, e podem variar significativamente entre as espécies conforme pode ser visualizado na Tabela 4 (SANTOS, 2013).

*Tabela 4- Composição de aminoácidos encontrada nas espécies de microalgas *Scenedesmus* sp.*
 Fonte: Adaptado Santos (2013)

Aminoácidos	(g · 100 g ⁻¹ de proteína)
Arginina	2,1
Asparato	8,4
Histidina	1,1
Lisina	1,5
Prolina	3,9
Triptofano	0,3
Fenilamina	4,8
Metioanina	1,5
Glutamato	11
Treonina	5,1
Leucina	7,3
Alanina	9
Isoleucina	3,6
Valina	6
Cisteína	0,6
Tirosina	3,2
Glicina	7,1
Serina	3,8

4.3.3 Lipídeos

Os Lipídeos (*lipos*=gordura) assim como as proteínas, atuam na formação da membrana celular dos seres vivos. As células das microalgas são ricas em ácidos graxos com alto teor lipídico, suas cadeias entre 14-20 carbonos apresentam características fisico-químicas semelhantes ao óleo produzido por outros vegetais, sendo promissores para a produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biometano). Já os ácidos graxos com cadeias maiores são usados como suplementos alimentares e aplicações farmacêuticas ou terapêuticas (COUGO, 2017).

Ainda segundo Cougo (2017), a composição lipídica da biomassa algal é a base de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados e insaturados e pode modificar entre as espécies de acordo com as condições ambientais de cada espécie e seu crescimento celular, atingindo um teor lipídico que pode variar entre 01 a 70 % (Tabela 05).

Tabela 5- Composição de Proteínas, Carboidratos e Lipídeos de microalgas.
Fonte: Adaptado de Cougo (2017)

Espécie	Proteína (%massa seca)	Carboidrato (%massa seca)	Lipídeo (%massa seca)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas rheinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	18
<i>Scenedesmus</i>	21	15	21-43

O óleo encontrado nas microalgas apresentam características físico-químicas similares ao óleo produzido por outras plantas. E, assim, pode ser considerado promissor para produção de biodiesel (ERAZO, 2017).

4.4 MERCADO PARA PRODUTOS DERIVADOS DE MICROALGAS

Atualmente, os produtos produzidos a partir de algas possuem alto valor agregado (Figura 5), movimentando no mercado de cosméticos, higiene pessoal, nutrição humana e animal, uma economia de bilhões por ano (BRASIL; GARCIA, 2016).

Todavia, a viabilidade econômica do cultivo em larga escala de microalgas enfrenta alguns desafios tecnológicos para uma produção competitiva diante de métodos eficientes para otimização do cultivo e processos de colheita. Assim, embora estudos apontem viabilidade técnica microalgal de produção energética em biocombustíveis, essa integração ainda não apresenta custos de produção competitivos com a indústria petroquímica (DURVASULA *et al.*, 2015).

Figura 5 - Mercado para produtos derivados de algas



Autor: Brasil e Garcia (2016)

4.5 CULTIVO DE MICROALGAS

O desenvolvimento de técnicas de cultivo para otimizar a produção de microalgas tem sido alvo de pesquisas entre os cientistas. Taher (2013) relata em seu artigo que a estrutura celular das microalgas *Scenedesmus* pode sofrer alterações nos processos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos, ocasionando interferências nas condições de crescimento e produção de lipídeos, assim como a composição da biomassa para diversas aplicações biotecnológicas.

O cultivo pode ser realizado em sistema fechado FBR ou em sistema aberto ao ar livre (lagoa). Estratégias de cultivo devem estimular o crescimento celular, entretanto, a produção precisa ter algumas precauções para evitar a contaminação, minimizar a evaporação de água, favorecer a absorção de luz, intensificar a produtividade desejada, buscando redução de custos operacionais. (SANTOS, 2013).

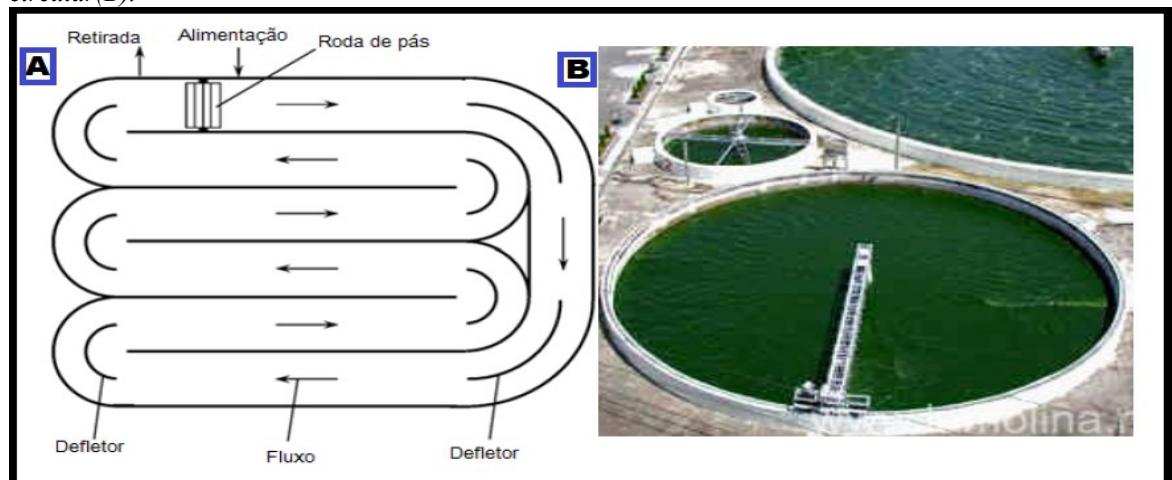
4.5.1 Temperatura

Dzuman (2013) relata em seus estudos que as microalgas sobrevivem a uma notável variabilidade de temperatura (16 a 38°C) conforme as necessidades de cada espécie cultivada. Essa alternância de temperatura interfere diretamente no crescimento celular, afetando a composição da biomassa frente aos componentes químicos e seu metabolismo, onde Ramirez (2013) afirma que a temperatura ambiente constante, mantida em torno de 25°C é desejável ao cultivo de microalgas, ocasionando uma maior produtividade.

4.5.2 Sistema aberto

No sistema “outdoor” (ao ar livre), a principal fonte de luz é a solar. Utilizadas desde a década de 1950, a produção em tanques abertos representa características próximas ao habitat natural de cultivo das microalgas, o sistema é dotado de variados formatos, podendo ser classificado em águas naturais (lagoas, lagos e açudes) e águas artificiais (tanques e containers) (Figura 6) (TOMAS, 2016).

Figura 6 - Visão superior esquemático de um tanque raceway pond (A). Cultivo de microalgas em lagoa circular(B).



Fonte: Adaptado de Santos (2013).

De acordo com a definição de Oliveira *et al.*, (2014), o mais utilizado é o tanque de *raceway pond*, consiste de um ciclo fechado tipo pista circulares, com cerca de 0,3 m de profundidade, com agitação e fluxo promovida através do uso de roda pás, hélices ou bombas, construídos e explorados a baixo custo, oferecem mais vantagens devido a facilidade de operação.

O sistema está sujeito a variações climáticas, mantendo-se a uma temperatura ambiente com altas probabilidades de evaporação, métodos para minimizar a contaminação são empregados ao meio de cultivo com adição de grandes concentrações de sais, o que restringe a adaptação de determinadas espécies (KLEIN, 2015; QIN; LEI; WU, 2018).

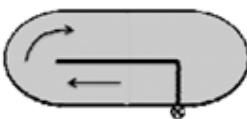
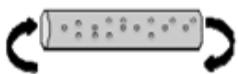
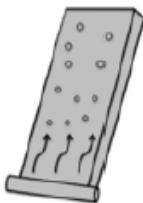
4.5.3 Sistema Fechado

O sistema “indoor” (espaço fechado) empregado para o cultivo de microalga é comumente chamado de fotobiorreator, mais adequados ao controle de variáveis. Apesar do custo elevado, apresentam vantagens em relação ao sistema aberto (FRANCO *et al.*, 2013). Dentre elas, podemos citar a redução na contaminação por microorganismos, evaporação moderada, maior reproduzibilidade, viabilizando o controle de temperatura, nutrientes, iluminação e pH, induzindo em um maior rendimento de biomassa (ESPINOSA *et al.*, 2014).

A utilização de FBR é mais adequada para o cultivo de microalgas, porém é necessário ficar atento a alguns requisitos para maximizar o desempenho, como permitir um maior aproveitamento da luz, e potencializar as trocas gasosas ao longo dos tubos, para que o processo de fotossíntese possa ocorrer de forma equilibrada sem interferir no crescimento celular (QIN; WU, 2019).

De acordo com Klein (2015) diferentes tipos de FBR têm sido desenvolvidos para o cultivo de microalgas, os mesmos podem ser descritos em formato de painel, tubulares, montado na vertical ou horizontal, transparentes feitos de vidro, acrílico ou plástico, apresentando vantagens e limitações específicas para cada espécie cultivada (Quadro 01).

Quadro 1 - Vantagens e limitações dos sistemas de cultivo de algas.
Fonte: adaptado de Tomas (2016)

Sistemas de Cultura	Vantagens	Limitações
Sistemas Abertos 	Relativamente econômicos Limpeza fácil Fácil manutenção Não utiliza terras agriculturáveis Necessita de pouca energia	Pouco controle das condições da cultura Pouca luz, homogeneização e utilização de CO ₂ Dificuldade de cultivar por longo período Pouca produtividade Limitados à algumas espécies Facilidade na contaminação
Fotobiorreatores Tubulares 	Relativamente econômicos Grande parte da superfície recebe iluminação Adequada para culturas ao ar livre Boa produtividade em biomassa	Gradientes de pH, oxigênio dissolvido e CO ₂ ao longo dos tubos Incrustação Algum grau de crescimento na parede Requer áreas de terra grandes Fotoinibição
Fotobiorreatores Planos 	Relativamente econômicos Limpeza fácil Grande parte da superfície recebe iluminação Adequada para culturas ao ar livre Baixo consumo de energia Boa produtividade em biomassa Baixo acúmulo de oxigênio	Difícil de executar em larga escala Difícil controle de temperatura Algum grau de crescimento na parede Estresse hidrodinâmico para algumas espécies Baixa eficiência fotossintética
Fotobiorreatores de Coluna 	Baixo consumo de energia Alta transferência de massa Boa homogeneização Melhor exposição aos ciclos dia-noite Baixo nível de tensão de cisalhamento Fácil de esterilizar Fotoinibição reduzida Fotoxidação reduzida	Pequena área da superfície recebe iluminação Materiais de construção sofisticados Tensão de cisalhamento Diminuição da área de superfície iluminada em larga escala Custo alto comparado aos sistemas abertos Custos de manutenção Baixo potencial para produção em escala

4.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO QUE AFETAM O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS DAS MICROALGAS

Segundo Fontoura (2017) é necessário que ocorra um equilíbrio entre os fatores físicos, químicos e biológicos, tais como a temperatura, iluminação, aeração, pH, concentração de inóculo e dias de cultivo. Essas variáveis influenciam diretamente no crescimento e produção lipídica da biomassa algal.

4.6.1 Intensidade Luminosa

Fotoautotrófica, a luz é um fator crucial para o desenvolvimento celular das microalgas *Scenedesmus*, a disponibilidade de radiação solar está interligada com a produtividade de biomassa durante o cultivo fotossintético. Arceo; Aranda e Díaz (2012), relatam em seus estudos que a intensidade luminosa contribui para potencialidade lipídica desses microrganismos, induzindo a produção de triacilglicerídeos, associados a composição de biocombustíveis. Conforme especifica Arceo; Aranda e Díaz (2012) que, em contrapartida, o excesso de luminosidade induz a fotoinibição, processo pelo qual pode-se afetar o crescimento celular e até mesmo provocar efeitos letais de alta toxicidade para as microalgas.

Em larga escala, uma iluminação artificial precisa simular as condições externas do meio ambiente, onde é satisfatório o uso de lâmpadas fluorescentes que simulem um comprimento de onda de 350 a 700 nm, indicado por Vidal (2016), como condição ótima para que as microalgas realizem fotossíntese, sendo induzido um sistema com exposição luminosa de 12 horas luz e 12 horas escuro.

4.6.2 Aeração e pH

A microalga *Scenedesmus* se adapta em condições de pH relativamente neutro a alcalino, embora seja fundamental obedecer limites de variações, pois uma instabilidade do sistema carbonato-pH pode interferir no metabolismo desses microrganismos, podendo ocasionar rompimento na membrana celular (FRANCO *et al.*, 2013).

A aeração pode ser realizada por compressores industriais, contribuindo assim para tornar o meio de cultivo estável e homogeneizado, equilibrando a concentração de pH da solução e favorecendo as trocas gasosas entre o ar e a cultura durante os processos de agitação, evitando assim o acúmulo de matéria orgânica e, consequentemente permitindo a recepção de luz (TOMAS, 2016).

4.6.3 Concentração de Inóculo

Cepas de microalgas cultivadas em água doce, tem produzido níveis elevados de lipídeos neutros, apresentando um perfil ideal para produção de biodiesel, sendo assim, é necessário que esse inóculo seja devidamente selecionado, optando por amostras que ofereçam máximo teor lipídico extraído de biomassa algal que apresente adaptação otimizada aos padrões de cultivo (SILVA *et al.*, 2019).

É importante selecionar a concentração ideal de inóculo para produção de microalgas Borges (2014), otimizando seu processo de cultivo, utilizou em sua unidade experimental reatores com volume total de 3 litros, adicionando 10% e 20% de inóculo de *Scenedesmus* sp. nos experimentos. Seus resultados mostram concentração lipídica satisfatória (54%) ao utilizar menor concentrações de inóculo, constatando em seus estudos que o teor de lipídeos não está ligado diretamente ao crescimento celular e sim à reserva nutricional do meio.

Os cultivos realizados em escala laboratorial por Taher (2013), a partir de cepas da microalga *Scenedesmus* sp., apresentaram uma concentração de 25% de inóculo, demonstrando crescimento de biomassa suficiente para possibilitar a extração do óleo e, em seguida, realizar a síntese de biodiesel.

4.6.4 Tempo de cultivo

A partir de estudos realizados com estirpes da microalga *Scenedesmus* Tomas (2016) conclui que entre o segundo e o décimo dia de cultivo as microalgas estão em fase de adaptação celular com o meio e as condições de cultura, buscando um equilíbrio fisiológico e bioquímico para potencializar seu desenvolvimento.

A porcentagem de inóculo inicial pode exercer influência sobre a densidade celular final. De acordo com os experimentos conduzidos por Ramirez (2013) em um período de 16 dias, condicionou uma produção de biomassa de 1,94 g/L, em que observou-se que a microalga *Scenedesmus* após a fase de crescimento linear (dias 10-25) pode ocorrer um decaimento na densidade celular.

Borges (2014) ao finalizar seu 22º dia de cultivo, apresenta 0,244 g/L de biomassa microalgal, apontando em seus estudos a importância de maximizar a fase estacionária da cultura entre (dias 10-16) e (dias 22-30) para obter melhor acúmulo lipídico das células da alga *Scenedesmus*, impedindo que a mesma após consumir os nutrientes do meio de cultivo, passe a utilizar suas reservas energéticas para prosseguir seu período de crescimento.

4.6.5 Necessidades nutricionais das microalgas

São reconhecidos cerca de 30 elementos tidos como essenciais para o crescimento e composição química das microalgas, ainda que as quantidades e os elementos variem de acordo com a espécie cultivada (SANTOS, 2018).

O meio de cultivo de microalgas deve conter nutrientes essenciais para o seu crescimento. Em sua composição química, há basicamente o carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), fósforo (P), ferro (Fe), hidrogênio (H), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn) e molibdênio (Mo), destacando elementos também importantes porém substituíveis como enxofre (S), potássio (K) e cálcio (Ca), além de manifestar a necessidade mesmo que em baixas concentrações de vitaminas como tiamina, biotina e cianocobalamina (DELGADO, 2019).

Gonçalves (2019) relata que sob condições adequadas, ainda que as quantidades e os elementos variem de acordo com a espécie cultivada os principais compostos limitantes frente ao crescimento celular das microalgas são o carbono, nitrogênio, o fósforo e o ferro.

Entre os principais elementos mencionados para o desenvolvimento das microalgas, Hakalin (2014) aponta o dióxido de carbono como contribuição fundamental para os processos fotossintéticos, mencionando também a importância das proporções de nitrogênio incorporadas ao cultivo, que irão contribuir para que a síntese proteica eleve o teor de proteínas presente na biomassa das microalgas.

Associado as trocas energéticas celulares e acúmulo de energia, Rodrigues; Pires e Batista (2019) apresentam em seus estudos a importância da presença de fósforo incorporado ao meio nutricional das microalgas, assim como as concentrações de ferro, nitrogênio e carbono, nutrientes ativos na respiração celular e fotossíntese.

A concentração dos nutrientes presentes no cultivo de microalgas, pode sofrer alterações, visto a necessidades específicas exigidas durante os processos metabólicos. As categorias primordiais para esse meio nutricional, são divididas em micronutrientes, que participam diretamente da funcionalidade enzimática, que também estão envolvidas nas vias metabólicas algais e macronutrientes que são fundamentais por atuarem nos processos de troca de energia e atividades metabólicas (BORGES, 2014).

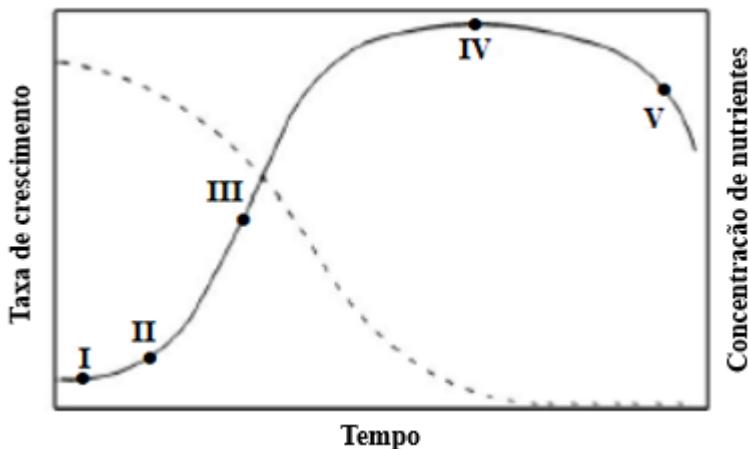
4.7 FASES DE CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Entre os regimes de cultivos mais utilizados, destaca-se o modo de operação por batelada, mediante sua simplicidade, minimizando as possibilidades de contaminação, que adiciona ao meio, todos os nutrientes necessários, antes de o cultivo começar, contudo o

desenvolvimento das microalgas pode sofrer alterações ao longo do processo, devido, as mudanças nas concentrações entre os nutrientes presentes, causando modificações na constituição química da biomassa e interferindo nas etapas de crescimento da microalga (PEREIRA, 2018).

A fase de crescimento (1) lag é um período que permite sua aclimatação ao meio de cultivo, garantindo sua sobrevivência, também conhecida como a fase de adaptação, em seguida vem a fase exponencial (2) log, em que há um aumento do crescimento constante e multiplicação das células a fase (3) é marcada pelo período de redução no crescimento, marcada geralmente pelo declínio nutritivo ao meio; na fase estacionária (4), inicia-se o equilíbrio na taxa de crescimento com percentual de morte celular, e por último, a fase de declínio ou morte celular(5). Costa (2018) apresenta o gráfico da Figura 7 com cada fase.

Figura 7 - Representação de uma curva de crescimento de microalgas em regime de batelada. Taxa de crescimento (linha sólida), concentração de nutrientes (linha tracejada) em função de um determinado período de tempo. Numerais romanos representam: I – fase lag ; II – fase log ; III – fase de redução do crescimento; IV – fase estacionária; e V – fase de declínio ou morte celular



Fonte: adaptado de Costa (2018).

4.8 MICROALGAS E A BIOTECNOLOGIA

A aplicabilidade das microalgas de maior relevância para esse estudo, se reflete no perfil energético, voltado ao ramo do biodiesel derivado de microalgas, pois além do aspecto de sustentabilidade, esses organismos se destacam frente as culturas tradicionais (oleaginosas), gerando uma rentabilidade satisfatória e viabilizando a utilização de terras não agriculturáveis e curto espaço de tempo (LIU *et al.*, 2019).

Por meio da biorrefinaria de microalgas é possível converter e utilizar sua biomassa para diversas aplicações biotecnológicas, lançando uma série de produtos, que vão desde

medicamentos, cosméticos, alimentos a base de proteína algal até a fabricação de combustíveis (Figura 8), sendo reconhecida por pesquisadores como um potencial estoque energético para produção de biocombustíveis (MCGINN *et al.*, 2019; SATI *et al.*, 2019; TOMAS, 2016).

Figura 8- Biorrefinaria de Microalgas

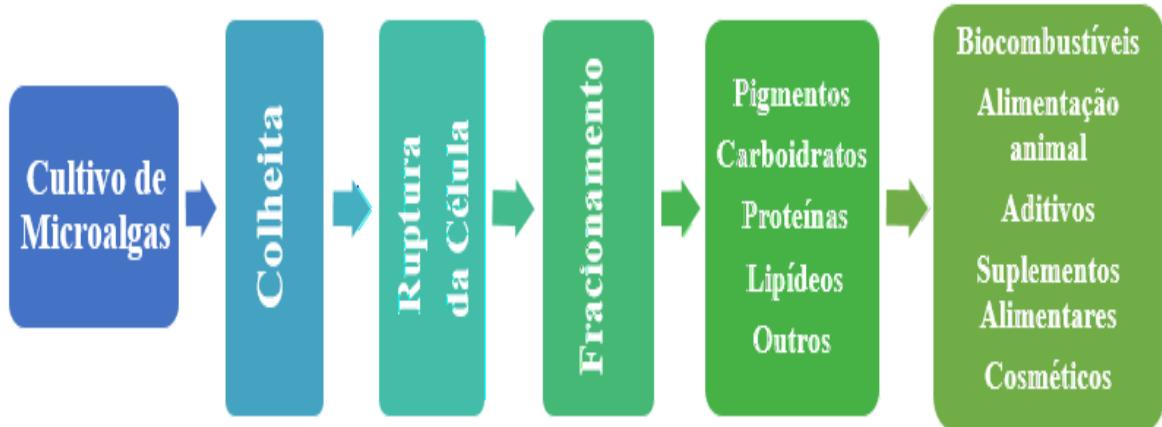
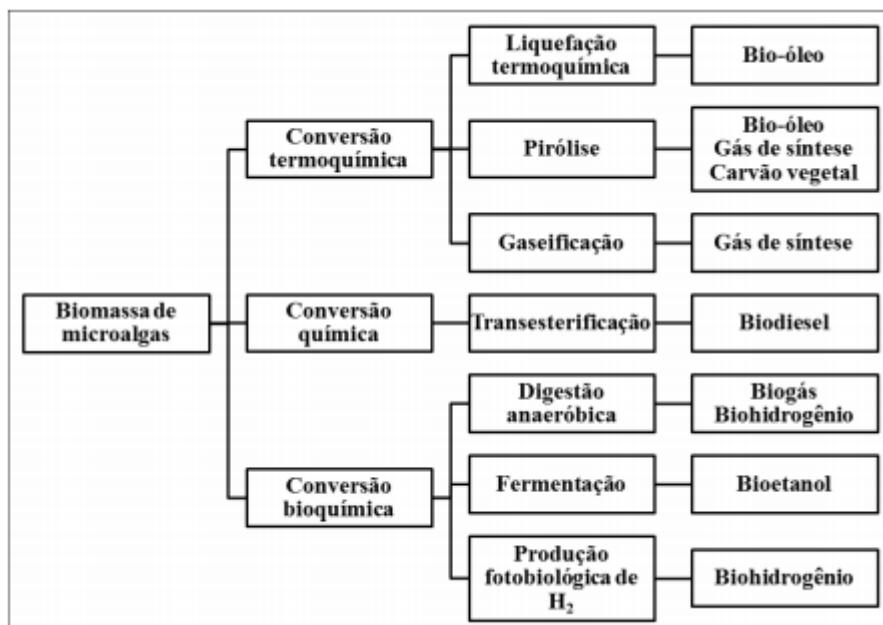


Foto: próprio autor

O balanço energético com a utilização de biomassa de algas frente aos biocombustíveis refletem uma gama favorável de aplicabilidade, tais como bioetanol, biometano, biohidrogênio, biogás e o biodiesel, obtidos por meio de conversão multidisciplinares, segundo pode ser analisado na Figura 9 (DIAS, 2017).

Figura 9 - Perfil das microalgas como fonte de energias renováveis



Autor: Adaptado de Santos (2013)

4.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento de experimentos propõe uma otimização metodológica, gerando um conjunto de experiências por uma matriz que expõe diversas combinações dos níveis dos fatores estudados para avaliar os efeitos e impactos que os fatores possuem em relação à resposta desejada (GOES, 2018).

Para Lopera; Alfaro e Motta (2012), essa metodologia de combinações matemáticas e estatísticas, permite descrever a atuação e interação dos fatores e seus efeitos individuais, avaliando suas interferências frente as respostas e os erros experimentais, executando previsões estatísticas.

A utilização de modelos estatísticos e matemáticos experimentais, possibilitou a Goes (2018) verificar a relação entre as resposta, conversão da reação de esterificação, de um óleo residual simulado a partir da acidificação de um óleo alimentar usado, obtendo um conteúdo em FAME de 0.9803, que representou um bom ajuste ao modelo estatístico, para produção de biodiesel por transesterificação.

Vieira (2019) executou um planejamento experimental com intuito de avaliar indicadores quantitativos de rompimento de células de *Scenedesmus obliquus*, objetivando a extração bifásica de lipídeos a partir de compostos celulares em biorefinaria. Ao comparar a variação da combinação dos níveis de fatores com a variação dos erros aleatórios associados às respostas geradas, concluiu-se que as condições ótimas para a extração bifásica de lipídeos a partir da biomassa coletada, obteve o maior rendimento quando a mesma ocorreu no sistema de mesa de agitação ultrassônica por 60 minutos no teor máximo de 6% (m/m) de biomassa por batelada.

Borges (2014) também utilizou um PCC para avaliar o crescimento da microalga *Scenedesmus* otimizando os nutrientes do meio de cultivo, por meio da técnica de superfície de resposta, concluindo que a produção de lipídeos foi favorecida quando se trabalha com 0,06 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,5 g/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, representando uma melhora de 161,7% no teor de lipídeos e de 16,9% na quantidade de óleo produzida e redução de 55,32% na concentração de biomassa seca.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 OBTENÇÃO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

A cepa da microalga *Scenedesmus* sp. utilizada nesse trabalho é proveniente do Laboratório de Química, do Instituto Luterano de Ensino Superior (ILES/ULBRA). Isoladas e mantida no LEMARC, Laboratório de Energias Renováveis, Materiais e Catálise, na Faculdade de Ciências Integradas do Pontal (Química) - UFU - Universidade Federal de Uberlândia. A manutenção, repiques e testes experimentais das cepas foram realizados em condições controladas, os quais os métodos operacionais e de crescimento são apresentados nas próximas seções.

5.1.1 Meios de Cultivo

A fim de comparar o comportamento dos cultivos em meios distintos e viabilizar a melhor condição de produção para as amostras de biomassa algal, utilizou-se os meios sintéticos Chu adaptado de Silva (2014) (Tabela 6) e Guillard (1975) modificado (Tabela 7) sem adição de vitaminas. Prepararam-se as soluções respectivas de cada meio, com as concentrações (g/L) de cada reagente utilizado para cada litro do meio de cultivo.

Para o preparo da solução nutricional Chu a ser adicionado ao meio de cultivo das microalgas, separou todos os reagentes apresentados na TABELA 6 para pesagem, em seguida a solução foi diluída em 1L de água destilada em um balão volumétrico graduado, armazenado posteriormente em frasco do tipo âmbar. Para iniciar o cultivo, é necessário adicionar 5 mL da solução preparada em um 1 L de água destilada.

Para realizar o cultivo de microalgas em meio nutricional Guillard, foi realizado a separação para pesagem em dois grupos, macro e micronutrientes conforme apresentados na TABELA 7, em seguida foram diluídos os grupos individualmente em 1L de água destilada em balão volumétrico graduado, separados e armazenados em frasco do tipo âmbar. Posteriormente, no momento de preparo, é necessário montar uma solução de 4 mL de meio nutricional Guillard a base de micronutrientes, mais 4 mL a base de macronutrientes e adicionar essas soluções em 1 L de água destilada.

Ambas as soluções armazenadas em frascos âmbar, foram mantidas na sala de cultivo por até seis meses em temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tabela 6 - Meio de cultivo Chu
Fonte: Adaptado de Silva (2014)

REAGENTE	FÓRMULA	QUANTIDADE (g.L ⁻¹)
Nitrato de sódio	NaNO ₃	0,25
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	0,075
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	0,175
Cloreto de sódio	NaCl	0,025
Tríplex III/EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	0,05
Hidróxido de potássio	KOH	0,031
Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄	0,00498
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,01142
Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 10 ⁻⁶
Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 10 ⁻⁶
⁻¹ Molibdato de sódio	NaMoO ₄ .2H ₂ O	1,19 10 ⁻⁶
Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 10 ⁻⁶
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 10 ⁻⁶

A partir dessas soluções preparadas, foram testadas duas fases de experimentos diferentes com os meios sintéticos, onde foi utilizado o meio Chu na concentração de 100% e na outra fase empregou-se o meio Guillard nas mesmas concentrações, conforme metodologia empregada por Borges (2014), em ambos os experimentos foram utilizadas a espécies de microalga *Scenedesmus* sp.

Tabela 7 – Meio de cultivo Guillard modificado sem adição de vitaminas
Fonte: Adaptado de Borges (2014)

Reagentes	Soluções e suas concentrações (g/L)	Meio de Cultivo
Solução 1: (macronutrientes)	CaCl ₂ .2H ₂ O = 36,76 MgSO ₄ = 18,04 NaHCO ₃ = 12,6 K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O = 11,41 NaNO ₃ = 85,01	4 mL/L ⁻¹
Solução 2: (micronutrientes)	Na ₂ EDTA = 4,36 FeCl ₃ .H ₂ O = 3,15 CuSO ₄ .5H ₂ O = 0,012 ZnSO ₄ .7H ₂ O = 0,022 CoCl ₂ .H ₂ O = 0,012 MnCl ₂ .4H ₂ O = 0,18 NaMoO ₄ .2H ₂ O = 0,008	4 mL/L ⁻¹

5.1.2 Condições de produção

As condições operacionais realizadas em escala experimental laboratorial, ocorreram em reatores horizontais, do tipo bandeja aberta em acrílico com volume total de 2 L, mas com volume útil de 1 Litro, fechados com plástico filme de pvc com perfurações alternadas para auxiliar na oxigenação e minimizar a evaporação, mantidos em temperatura ambiente de 25°C ± 1°C, com controlador de fotoperíodo em 12 horas de luz e 12 horas de escuro, utilizando 3 lâmpadas fluorescentes brancas de 40 Volts (Figura 10), semelhante à unidade experimental adotada por Ramirez (2013).

Figura 10- Condições operacionais para o cultivo de *Scenedesmus* sp.



Fonte: próprio autor

Para verificar se o tempo de cultivo (dias) e a porcentagem de inóculo causariam interferências na produtividade de microalga *Scenedesmus* sp., junto ao meio sintético de cultivo, as condições experimentais de produção foram otimizadas com base em um planejamento fatorial 2³, no qual cada variável (meio de cultivo, tempo e % de inóculo) foi estudada em dois níveis, realizando um total de 8 experimentos a partir da combinação de todas as condições.

O meio de cultivo, o tempo e a porcentagem de inóculo são variáveis importantes para o crescimento das algas e, portanto, para a quantidade de lipídeos formadas por elas, neste sentido e visando minimizar o número de experimentos realizados e o tempo gasto, utilizou-se o planejamento fatorial 2³.

A partir das variáveis selecionadas e seus níveis, foi construída a matriz do planejamento fatorial 2^3 , que apresenta a combinação de todas as condições experimentais para o cultivo das algas visando a produção de lipídeos. A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento de experimentos, realizada para otimização do processo de cultivo das algas estudadas.

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 , para variações no meio de Cultivo. Variáveis: M: Meio de Cultivo, T: Tempo de cultivo em dias e I: Porcentagem de Inóculo.

Ensaio	Variáveis					
	M	(Meio)	T	(Tempo em dias)	I	(%Inóculo)
1	-	(Chu)	-	(20)	-	25
2	+	(Guillard)	-	(20)	-	25
3	-	(Chu)	+	(30)	-	25
4	+	(Guillard)	+	(30)	-	25
5	-	(Chu)	-	(20)	+	35
6	+	(Guillard)	-	(20)	+	35
7	-	(Chu)	+	(30)	+	35
8	+	(Guillard)	+	(30)	+	35

5.1.3 Crescimento celular e biomassa seca produzida

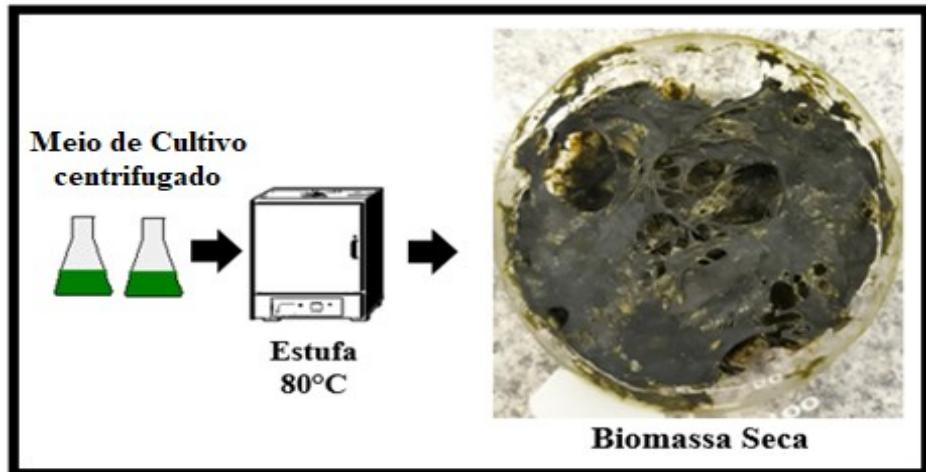
Para determinação de biomassa produzida e crescimento celular, foram utilizadas análise de massa seca e densidade celular. Essa metodologia permite a comparação dos dados de densidade ótica também conhecido como absorbância, com as quantificações de massa seca, propiciando a criação de curva de calibração, para identificação das fases de crescimento das microalgas e determinação do período de acúmulo de lipídeos pelas células, a mesma empregada por Sant' Anna *et al.*, (2012).

As leituras de densidade ótica foram realizadas a cada cinco dias em triplicata de cada alíquota de cultivo no comprimento de onda de 570 nm, com auxílio do espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800).

Para colheita de biomassa e determinação de sua massa seca ($g\text{L}^{-1}$), os volumes totais dos reatores foram submetidos a centrifugação (AAKER), a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante composto pelo meio de cultivo, foi descartado para que o sedimento de biomassa fosse alocado em béquer previamente pesados, levados para secagem em estufa a 80°C por 48

horas (Figura 11). Para realizar a quantificação de biomassa seca final, expressas em g/L, as amostras foram pesadas de acordo com a metodologia indicada por Ramirez (2013).

Figura 11 - Processo de colheita e secagem de biomassa da microalga *Scenedesmus* sp.

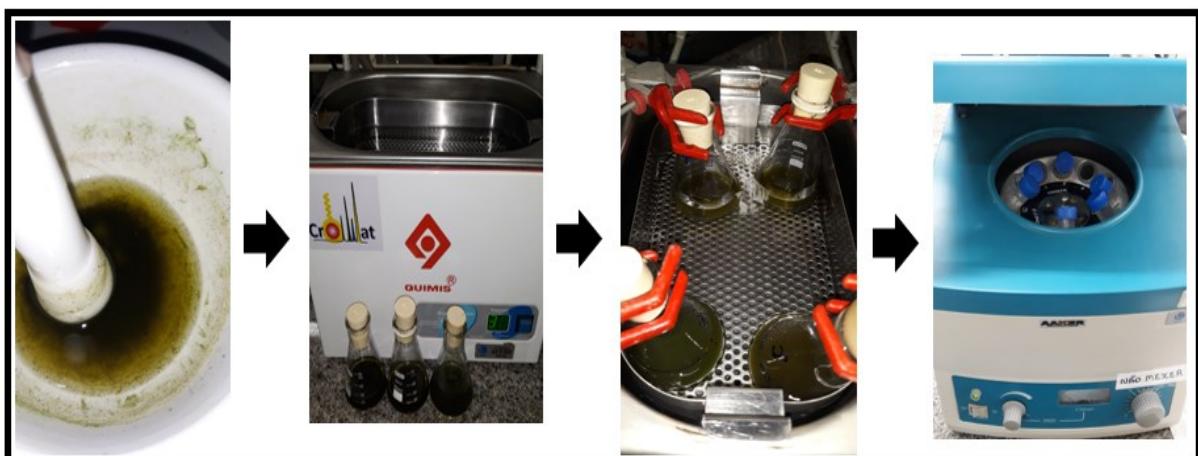


Fonte: próprio autor

5.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

Após a colheita de biomassa seguida de centrifugação e secagem, o total da amostra de aproximadamente 1000 mg foi submetida à extração de lipídeos conforme metodologia descrita por Folch; Lees; Stanley (1956). Inicialmente macerada em cadinho de porcelana foram adicionados 40 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol. Em seguida, a mistura foi transferida pra erlenmeyer de 125 mL submetida à 90 minutos cada, em banho ultrassom (QUIMIS - Ultrasonic Cleanner 1400, frequência de 40 kHz), para auxiliar na ruptura celular. Logo após, a amostra foi centrifugada (Figura 12).

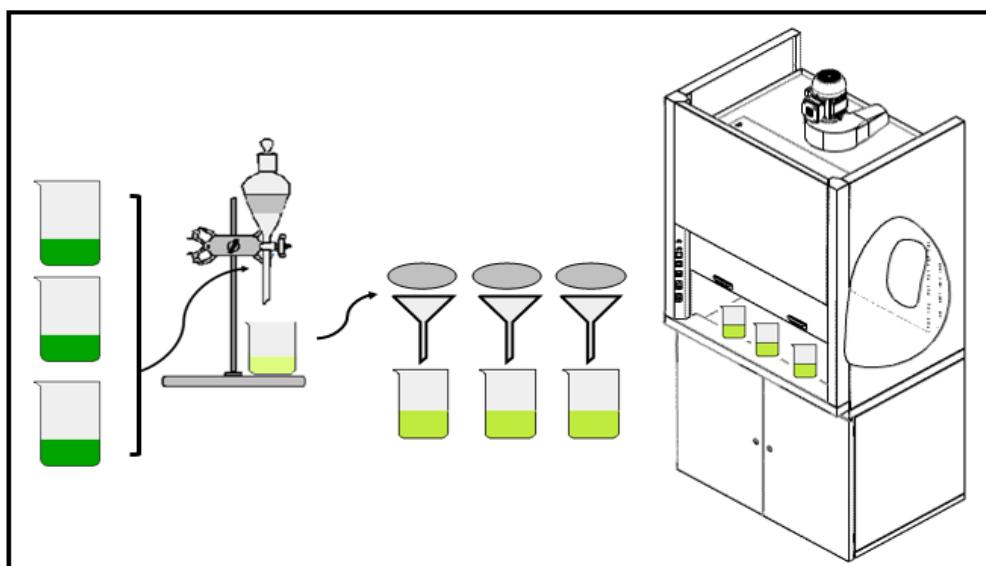
Figura 12- Extração de óleo da *Scenedesmus* sp. utilizando, cadinho, banho ultrassônico e centrífuga.



Fonte: próprio autor

Ao final dos ciclos, em que a amostra foi centrifugada por 8 minutos, a parte sólida sedimentou-se e o sobrenadante contendo os lipídeos foi transferido para um béquer de 200 mL, com solução de 12 mL de KCl 0,88%. Esse foi submetido a agitação e encaminhados para o funil de separação. Após a formação de duas fases, reservou-se a fase contendo os lipídeos adicionando 4 mL de mistura metanol/água 1:1, submetendo o funil com a mistura à nova agitação. A fase superior foi retirada por sucção com auxílio de pipeta graduada e descartada, e a fase inferior contendo lipídeos foi filtrado com sulfato de magnésio. Em seguida, foi transferida para um balão volumétrico submetido a uma capela de exaustão para completa evaporação dos solventes (Figura 13).

Figura 13- Processo representativo do sistema de extração de óleo da microalga *Scenedesmus* sp. utilizando, funil de separação, secagem com sulfato de magnésio, filtragem e capela de exaustão.



Fonte: próprio autor

Posteriormente, a massa dos frascos contendo o óleo produzido em cultivo, foi aferida para que o cálculo gravimétrico fosse realizado obtendo a mensuração do teor lipídico total em porcentagem de acordo com a Equação 1.

Equação 1

$$\text{Teor de Lipídeos (\%)} = \frac{(\text{massa de óleo produzida}) \times 100}{(\text{massa da biomassa}) \times 1L} =$$

Sendo:

- Massa de óleo produzido: expressa em gramas.
- Massa de biomassa: expressa em g/L

5.3 ESTIMATIVA DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

A partir do planejamento fatorial 2^3 foi possível verificar quais variáveis empregadas ao meio de cultivo proporcionaram melhores resultados para produção de biomassa, expressa em g/L e de óleo, indicando o teor lipídico em porcentagem mássica. Assim, este planejamento está sendo realizado com a finalidade de selecionar os parâmetros qualitativos que apresentarem melhor desempenho em relação às variáveis estudadas para serem usados em um segundo planejamento quantitativo, o Planejamento Composto Central.

A utilização do planejamento fatorial, requer diferentes combinações dos níveis dos fatores estudados através do planejamento de experimentos 2^2 , tendo assim viabilizado dados para a produção de uma matriz que apresentou o melhor desempenho das variáveis de resposta, a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e curvas de contorno (GOES, 2018).

O PCC foi realizado com duas variáveis, resultando em 11 experimentos entre os níveis dos fatores de interesse, composto por 4 pontos cúbicos (+1 e -1), 4 pontos axiais (+ α e - α) e 3 repetições no ponto central. As variáveis analisadas foram a concentração de nutrientes do meio Chu (%) e o tempo de cultivo (dias). A variável resposta dos planejamentos foi o teor de lipídeos determinado pelo método de extração de Folch; Lees e Stanley (1956).

A Tabela 9 apresenta as variáveis e os níveis que foram avaliados na otimização da extração, enquanto a Tabela 10 representa a matriz de contraste das variáveis codificadas.

Tabela 9. Variáveis e níveis da otimização do teor lipídico

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	1	1,4
(1) Concentração Meio Chu (%)	40	50	75	100	110
(2) Tempo (dias)	12	15	22	30	33

Tabela 10 - Matriz de planejamento composto central em 2 variáveis para otimização do teor lipídico (1- Concentração Meio Chu em porcentagem (%) e 2 - Tempo em dias)

Experimento	Codificado		Valores Reais	
	1	2	Meio	Tempo
1	-	-	50	15
2	+	-	100	15
3	-	+	50	30
4	+	+	100	30
5	0	0	75	22
6	0	0	75	22
7	0	0	75	22
8	-1,41	0	40	22
9	+1,41	0	110	22
10	0	-1,41	75	12
11	0	+1,41	75	33

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software Statistica 7.1, da StatSoft, explorando quais variáveis interferem em determinadas respostas, utilizando conceitos de estatística descritiva, análise multivariada e metodologia de superfície de resposta. Após concluir todas as análises expostas, a faixa ótima de cada variável foi identificado.

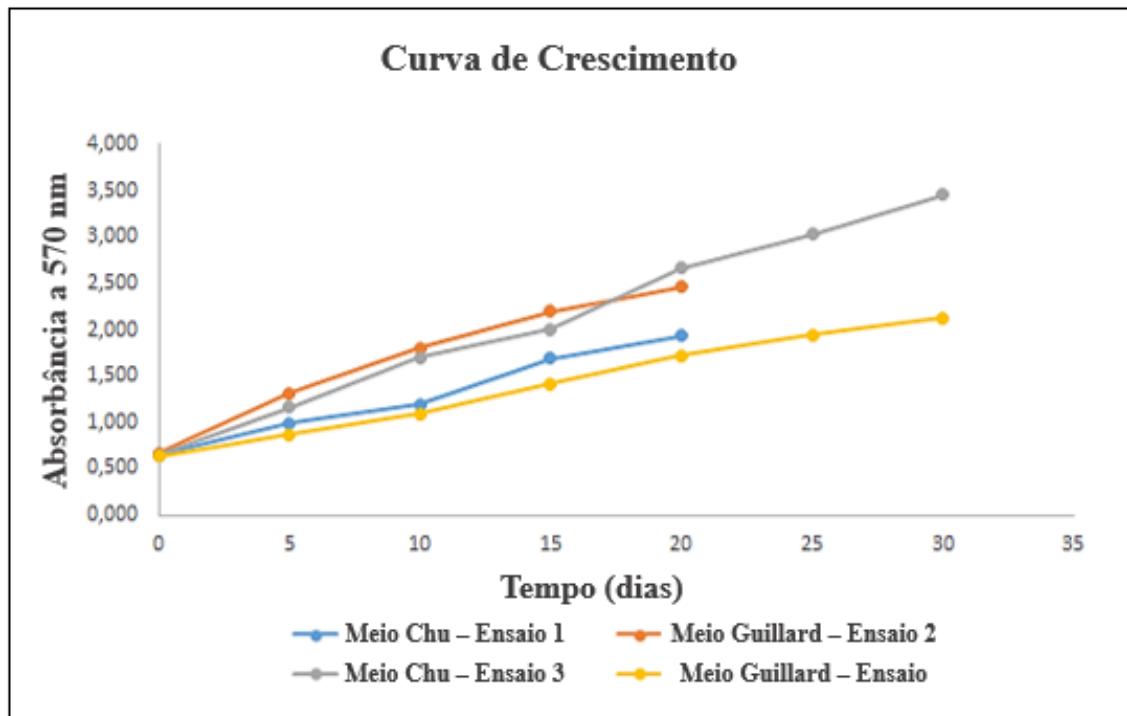
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Serão apresentados abaixo os resultados dos experimentos realizados dentro do planejamento fatorial 2^3 , para verificar quais das variáveis estudadas são significativas ou não para produção de biomassa da microalga e teor lipídico.

6.1 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *SCENEDESMUS SP.* EM CULTIVOS COM MEIO CHU E GUILLARD.

Nos ensaios 1 e 3 a microalga *Scenedesmus sp.* foi cultivada em meio Chu, em período de 20 dias (ensaio 1) e 30 dias (ensaio 3). Com relação aos ensaios 2 e 4 o cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* teve como nutrientes disponíveis o meio Guillard, em período de 20 dias (ensaio 2) e 30 dias (ensaio 4). O crescimento celular de ambos os quatro cultivos foi monitorado a cada cinco dias por absorbância a 570 nm, analisando a densidade óptica. Verifica-se na Figura 14, o perfil de crescimento das algas (Absorbância) nos respectivos tempos de cultivo analisados.

Figura 14- Crescimento celular analisado nos ensaios experimentais em meio nutricional Chu e Guillard.



Fonte: próprio autor

Observa-se que a densidade celular da microalga originou uma fase de crescimento gradativo em todos os ensaios experimentais. Os resultados do ensaio 2 mantiveram-se superiores ao ensaio 1 cerca de 21% mais eficaz, ao serem submetidos a um tempo de cultivo de 20 dias. Quando relacionados os ensaios 3 e 4, o percentual de desenvolvimento é ainda mais satisfatório, o ensaio 3 apresentou em seus parâmetros taxa de crescimento elevada na ordem de 53% a mais que o estimado para o ensaio 4. Ambos foram condicionados ao cultivo de 30 dias.

Esses dados mostram que é possível desenvolver um cultivo durante um período de 30 dias otimizando as taxas de crescimento dos organismos, visto que a evolução das microalgas apresenta desenvolvimento até por volta dos 30 dias de cultivo, quando inicia-se um período de decréscimo celular, indicativo do declínio dos nutrientes com o passar do tempo, após consumo dos mesmos pelas microalgas (SANTOS, 2016).

6.2 ENSAIOS REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO NO CULTIVO DE MICROALGAS

A biomassa, produzida dos meios de cultivo, foi submetida a centrifugação e secagem para extração de óleo conforme metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1956). Posteriormente, a massa dos frascos contendo óleo produzido foi aferida para que o cálculo gravimétrico fosse realizado obtendo ao final do processo metodológico a mensuração do teor lipídico total em porcentagem.

A metodologia de cultivo estudada com intuito de avaliar se as variáveis selecionadas possuem influência na formação lipídica da microalga *Scenedesmus sp.*, foi a partir de um planejamento fatorial 2³. As três variáveis escolhidas são: meio de cultivo, tempo de cultivo em dias e porcentagem de inóculo, empregando dois níveis para cada variável.

A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento de experimentos e as interações entre as variáveis, a fim de observar a influência de uma variável sobre o rendimento lipídico no cultivo das microalgas.

Tabela 11 - Matriz do planejamento de experimentos com resultados do teor lipídico obtido das algas de acordo com o planejamento factorial 2³.

Ensaio	Variáveis							% T.L
	M	T	I	MxT	MxI	TxI	MxTxI	
1	-	-	-	+	+	+	-	1,70
2	+	-	-	-	-	+	+	0,29
3	-	+	-	-	+	-	+	10,87
4	+	+	-	+	-	-	-	0,50
5	-	-	+	+	-	-	+	5,23
6	+	-	+	-	+	-	-	1,94
7	-	+	+	-	-	+	-	11,02
8	+	+	+	+	+	+	+	3,41

Com os resultados obtidos do teor de lipídeos calculou-se os efeitos das variáveis em cada ensaio. Os efeitos foram obtidos a partir da diferença entre as respostas médias de teor de lipídeos nos níveis superior e inferior para cada variável, conforme Equação 2:

Equação 2:

$$E_f = \overline{\%T.L_{(+)}} - \overline{\%T.L_{(-)}}$$

Em que (E_f) é o efeito da variável, ($\overline{\%T.L_{(+)}}$) corresponde à porcentagem média aritmética de teor lipídico das variáveis de nível altos e ($\overline{\%T.L_{(-)}}$) representa a porcentagem média de teor lipídico que apresentam nível baixos. A equação foi aplicada para cada variável estudada, obtendo os valores de efeito apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeitos das variáveis estudadas e suas interações na porcentagem de lipídeos obtidas no cultivo da microalga

	Variáveis	Efeitos
1	Meio de Cultivo	- 5,66
2	Tempo de cultivo (dias)	+ 4,17
3	Porcentagem de inóculo (%)	+ 2,07
12	Meio x tempo	- 3,33
13	Meio x inóculo	+ 0,21
23	Tempo x inóculo	- 0,54
123	Meio x tempo x inóculo	+ 1,17

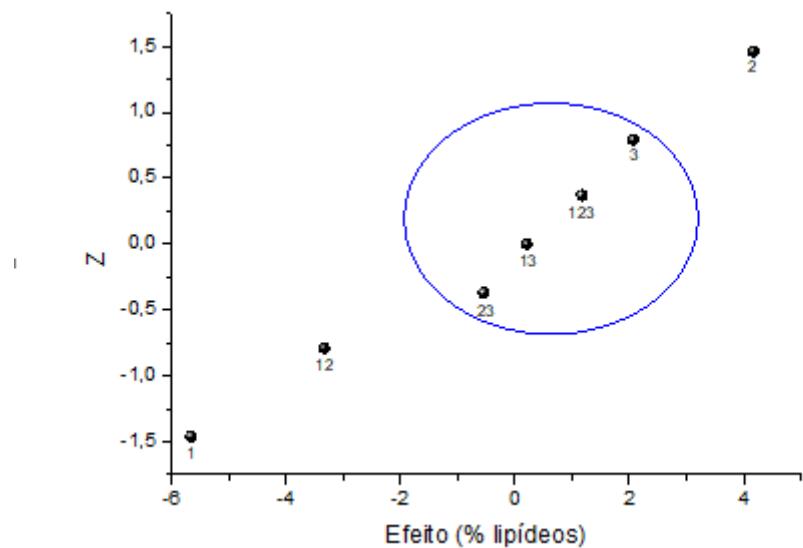
De acordo com os valores de efeito, a porcentagem de inóculo, dentro dos níveis estudados (25 e 35 %), apresentou a menor influência no teor de lipídeos produzidos. O tempo de cultivo e o meio apresentaram efeitos próximos, com maior importância para o meio de cultivo usado. O sinal negativo do efeito do meio de cultivo indica que o nível baixo possui maior influência na porcentagem de lipídeos, ou seja, o meio Chu se mostra mais promissor no cultivo das algas para obtenção de lipídeos do que o meio Guillard.

Como os experimentos não foram realizados em replicatas, o erro dos efeitos não pôde ser estimado a partir de variâncias individuais dos experimentos. Mas existe outra forma de estimar o erro dos efeitos sendo realizada pela análise do gráfico normal dos efeitos, no qual os efeitos mais dispersos de um valor padronizado (Z) igual a zero são estatisticamente significativos.

Para construir o gráfico normal de efeitos foi realizado o cálculo das interações entre os fatores, resultando no total de sete efeitos: três efeitos principais, três interações de dois fatores e uma interação de três fatores. Para o cálculo dos efeitos de interação de variáveis multiplicou-se os sinais dos níveis de elemento a elemento. Primeiro, as interações das variáveis são determinadas pela multiplicação dos níveis de duas a duas, depois de três a três variáveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A significância dos efeitos pode ser melhor observada através do gráfico normal dos efeitos, Figura 15.

Figura 15 - Gráfico normal de efeitos para o cultivo das algas. Sendo que 1 corresponde ao meio de cultivo, 2 ao tempo de cultivo e 3 à porcentagem de inóculo.



Fonte: próprio autor

Os valores de efeitos mais dispersos de um valor padronizado (Z) igual a zero são estatisticamente significativos, e aqueles que se aproximam deste valor não possuem influência significativa na resposta.

No gráfico observa-se que os pontos nas extremidades são os mais dispersos e, por isso, são os dois únicos significativos para o cultivo das algas. Na área azul estão os valores de efeito menos significativos, sendo uma variável discreta, e as demais interações entre as variáveis.

A variável em questão, mostrada como o ponto 3 no gráfico, se refere a porcentagem de inóculo e como já havia visto anteriormente, teve pouco influência no teor de lipídeos.

A interação indicada pelo ponto 12 está fora da área marcada, porque se distancia de zero, porém como uma interação tem força menor em relevância para a resposta quando comparada a uma variável principal, contudo nos indica que não apenas o meio de cultivo (ponto 1) e o tempo (ponto 2) são importantes, coexiste uma resposta positiva à interação destas duas variáveis.

O meio de cultivo (ponto 1), está na área negativa do gráfico, portanto precedido pelo sinal negativo que nos indica que o nível baixo (meio Chu) foi o que proporcionou melhor resultado para a produção de lipídeo. Com o tempo de cultivo (ponto 2) ocorreu o contrário, ele está na região positiva do gráfico e o nível alto (30 dias) foi mais importante para a produção de lipídeos.

6.3 AVALIAÇÃO GERAL DE BIOMASSA SECA E TEOR LIPÍDICO PRODUZIDO

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos através de um conjunto de variáveis, pelo qual analisou-se o crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* (SCN) em meio Chu e Guillard, adicionando 25 e 35% de inóculo, a serem cultivados em um prazo entre 20 dias e 30 dias, em ensaios distintos.

Tabela 13 - Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e Teor Lipídico das microalgas *Scenedesmus sp.*

	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor Lipídico (%)
Ensaio 1	1,32	0,022	1,70
Ensaio 2	1,67	0,004	0,29
Ensaio 3	2,26	0,246	10,87
Ensaio 4	1,08	0,005	0,50
Ensaio 5	1,57	0,082	5,23
Ensaio 6	0,93	0,018	1,94
Ensaio 7	1,76	0,194	11,02
Ensaio 8	1,17	0,039	3,41

* quantidade produzida por reator com capacidade de 1 litro.

No ensaio 1, aplicou-se Meio Chu acondicionando 25% do volume útil do reator de inóculo, em um prazo de cultivo de 20 dias, foi encontrado uma produtividade de biomassa final da ordem de 1,3216 g/L. Em um experimento conduzido por Costa (2018), uma microalga também pertencente à família *Scenedesmaceae*, cultivada em meio sintético com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W com fotoperíodo de 12/12h de luz/escuro, apresentou crescimento máximo de biomassa equivalente a $1,21 \text{ g/L}^{-1}$ ao final do 28º dia de cultivo, apresentando assim maior tempo de cultivo e menor rendimento.

Referente ao teor de lipídeos extraído da biomassa seca, o ensaio 1 apresentou percentual de 1,70%, considerado baixo por Oliveira *et al.* (2014) frente a média padrão de 19,6 a 21,1% para *Scenedesmus sp.* No entanto, é importante ressaltar que o ensaio 1 apresentou melhor rentabilidade, 1,48% a mais de lipídeos em sua extração quando comparado ao experimento realizado por Erazo (2017), que expõe em sua pesquisa um cultivo com a microalga *Scenedesmus sp.* em FBR de placa plana durante um período de 15 dias, ressaltando assim a necessidade de se investir em otimizações no processo de cultivo para elevar o rendimento lipídico final.

Mantendo o período de 20 dias de cultivo com adição de inóculo referente a 25%, apresentando variação apenas quanto ao meio quando comparado os parâmetros com o ensaio 1, estabeleceu-se as variáveis do ensaio 2, o qual utilizou Guillard como meio base, resultando em uma maior quantidade de biomassa seca produzida (1,67 g/L). Desempenho semelhante obtido por Pena *et al.*, (2017), em seu plano experimental estava sob intensidade luminosa, utilizando fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, à uma temperatura ambiente (25°C), durante

período de 20 dias, ressaltou em seus resultados concentrações máximas equivalentes a 1,75 g.L⁻¹ para o cultivo da microalga *Scenedesmus sp.*, e 1,64 g.L⁻¹ para a *Chlorella sp.*

Verificou-se baixa concentração de óleo produzido no ensaio 2 (0,004 g), mensurando um teor lipídico de 0,29%. Embora ambos tenham proporção de inóculo inicial (25%) e tempo em cultivo de 20 dias, o ensaio 2 está associado a outro meio sintético, o meio Guillard, determinando uma produção de biomassa de 1,67 g/L, maior que valores encontrados por Erazo (2017), que alcançou durante um experimento com a microalga *Scenedesmus sp.* concentrações de 1,5 g/L, em ambiente climatizado, iluminado por duas lâmpadas tipo LED tubulares de 12 W cada uma, em fotoperíodo com 24 horas de claridade.

Para o crescimento das microalgas em taxas satisfatórias deve ser observado seu rendimento lipídico, o que indica produção óleo. No ensaio 2 foi utilizado o meio Guillard, o qual desempenhou maior rendimento de biomassa quando comparado ao ensaio 1, porém os dados se diferem frente ao teor de lipídeos produzidos por ambos, sendo que o cultivo submetido ao meio Chu (ensaio 1) indicou 1,3845% a mais de óleo.

Acredita-se que o processo metabólico possa estar condicionado a esse resultado, em que a microalga *Scenedesmus sp.* estivesse enfrentando dificuldades de se adaptar ao meio de cultivo Guillard ao longo de seu crescimento e multiplicação celular, sendo possível que ela esteja consumindo seu óleo produzido, visto que essa é uma substâncias de reserva nutricional para continuar o crescimento (BORGES, 2014).

Esse resultado obtido no ensaio 2, onde elevada biomassa indicou baixo teor de óleo comparado as condições atribuídas ao ensaio 1, foi essencial para constatar que a produção lipídica não está diretamente ligada ao crescimento celular. Há diversas variáveis (temperatura, luz, pH, aeração, nutrientes) que podem interferir no cultivo de microalgas, porém é pertinente mencionar os fatores biológicos que variam entre as espécie e seus armazenamentos metabólicos de reservas nutricionais (BORGES, 2014; SILVA, 2014).

Oliveira *et al.*, (2014) otimizando seu meio de cultivo Chu adicionando porcentagem de efluente de bovinocultura biodigerido, para a microalga *Scenedesmus sp.*, empregou parâmetros de temperatura controlada a 22° ± 2 °C, luminosidade com fotoperíodo 12:12, e bombas de aeração constante, quantificou uma extração lipídica de 14,91% para 10% efluente utilizado como meio nutricional adicional.

Para avaliar o perfil do óleo da microalga *Scenedesmus sp.*, como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas, Dzuman (2013) utilizou meio concentrado Chu, com controle de temperatura de 20 ± 2°C, aeração, iluminação fluorescente branca de 40 Volts, 12 horas de luz

e 12 horas de escuro, obtendo produtividade de biomassa seca equivalente a 677 mg. L⁻¹ e 16% de bio-óleo.

Seguindo essa linha de raciocínio onde o meio Chu vem se destacando, os ensaios 1 e 3 cultivados nas mesmas condições de meio e variação de inóculo, quando submetido ao cultivo por 30 dias (ensaio 3), o experimento apresentou maior concentração de teor lipídico (10,87%). Indica-se que o tempo de 30 dias, aparentemente é mais promissor do que a variável do ensaio 1 (20 dias). Segundo estudos apontados por Ramirez (2013), a microalga *Scenedesmus sp.*, entra e fase exponencial de crescimento a partir do décimo dia de cultivo, onde se faz necessário avaliar o ciclo de operação para que o cultivo em fotobiorreatores obtenha a concentração máxima de biomassa em tempo de cultivo favorável com a presença de nutrientes para uma colheita satisfatória.

De acordo com os resultados obtidos por Vidal (2016), a biomassa seca e o teor de lipídeos dessas microalgas foram melhorados quando cultivadas em meio com adição de nutrientes residuais presentes no efluente; apresentando um teor de lipídeos de 10,42%, resultado ainda inferior ao desempenho obtido pelo cultivo em ensaio 3.

É possível observar que o meio de cultivo Chu vem sempre apresentando melhores resultados, inclusive quando comparados os ensaios 1 e 2, onde ambos apresentavam em seus parâmetros, o mesmo tempo de cultivo (30 dias) e presença de inóculo inicial (25%), variando apenas o meio. O ensaio 2 cultivado em meio Guillard demonstrou baixo teor lipídico quando comparado ao percentual obtido no ensaio 1, com cerca de rendimento 83% menor.

Embora o fator tempo, tenha sido promissor ao rendimento de biomassa quando analisado os ensaios 1 e 3 cultivados em meio Chu, ao serem submetidos a variação de meio, as estirpes que apresentaram crescimento exponencial em meio Guillard, foram cultivadas em 20 dias. Borges (2014), relata em seus resultados, que a microalga *Scenedesmus sp.*, cultivada no meio Guillard em unidade experimental com controle de variáveis de iluminação, temperatura e aeração, entra em estabilidade de crescimento entre o décimo e décimo sexto dia, passando para fase de declínio e morte celular.

A variação em porcentagem de inóculo inicial (35%) no meio Chu, também foi analisada. No ensaios 5, a biomassa seca quantificada foi superior quando comparada com a biomassa do cultivo desenvolvido nos ensaios 1, onde ambos estavam em meio Chu, e o mesmo comportamento pode ser observado para o teor lipídicos. Esses resultados sugerem a possibilidade de aumentar a porcentagem de inóculo inicial para 35%, aumentando assim de 68% a produtividade de teor lipídico e de 16% a produtividade em biomassa.

A concentração de teor lipídico produzida durante o cultivo do ensaio 8 variou significativamente comparado ao ensaio 6, as condições em que as microalgas são submetidas ao meio de cultivo podem afetar seu rendimento metabólico e, assim, consequentemente o acúmulo de lipídeos na célula. Visto que o ensaio 8 apesar de manter os parâmetros de meio e porcentagem de inóculo, ao alterar o tempo de cultivo os resultados indicaram um aumento de 43% no teor lipídico.

Na Tabela 13 pode se observar uma relação de otimização nos estudos direcionados ao cultivo da microalga *Scenedesmus sp.*, e seus respectivos rendimentos de teor lipídico. De acordo com os valores observados no ensaio 3 e 7, percebe-se que os rendimentos variam, dependendo da porcentagem de inóculo. Nota-se que Gouveia *et al.*, (2016) ao cultivar a *Scenedesmus* em fotobioreatores com luz contínua e temperatura de 25°C obteve teor lipídico de 8,1%, em um período de 10 dias.

Levando-se em conta que no ensaio 7 o rendimento em teor lipídico foi de 11,02%, a alteração na porcentagem de inóculo não apresentou dados significativos, ficando sugestivo a aplicação de novas variáveis frente ao tempo de cultivo e ao meio Chu, para tentar obter um rendimento maior de teor lipídico, à medida que os parâmetros relacionados ao meio Chu e ao tempo se destacaram entre as variáveis.

6.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para otimização do teor lipídico extraído das microalgas foram realizados experimentos embasados em um planejamento estatístico do tipo planejamento composto central (PCCR), analisando as variáveis, concentração de nutrientes do meio Chu (%) e o tempo de cultivo (dias), conforme disposto na Tabela 14. Como resposta dos experimentos, a partir desse modelo estatístico, foram obtidas como respostas o teor de lipídeos, expresso em %, a quantidade de óleo produzidos, em gramas e biomassa seca (g/L). Todos os ensaios experimentais foram realizados em duplicatas, e os resultados apresentados são a média dos valores obtidos.

*Tabela 14 – Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e Teor Lipídico das microalgas *Scenedesmus* sp. em processo de otimização de cultivo*

	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor Lipídico (%)
Ensaio 1	1,0255	0,0258	2,5
Ensaio 2	0,9992	0,0243	2,6
Ensaio 3	0,936	0,0092	9,9
Ensaio 4	0,9682	0,0124	1,2
Ensaio 5	0,873	0,0738	8,4
Ensaio 6	1,0602	0,0956	9,0
Ensaio 7	1,1157	0,0963	8,6
Ensaio 8	0,8957	0,1336	14,9
Ensaio 9	0,987	0,0347	1,5
Ensaio 10	0,9797	0,0394	4,0
Ensaio 11	1,0887	0,0689	6,3

* quantidade produzida por reator com capacidade de 1 litro.

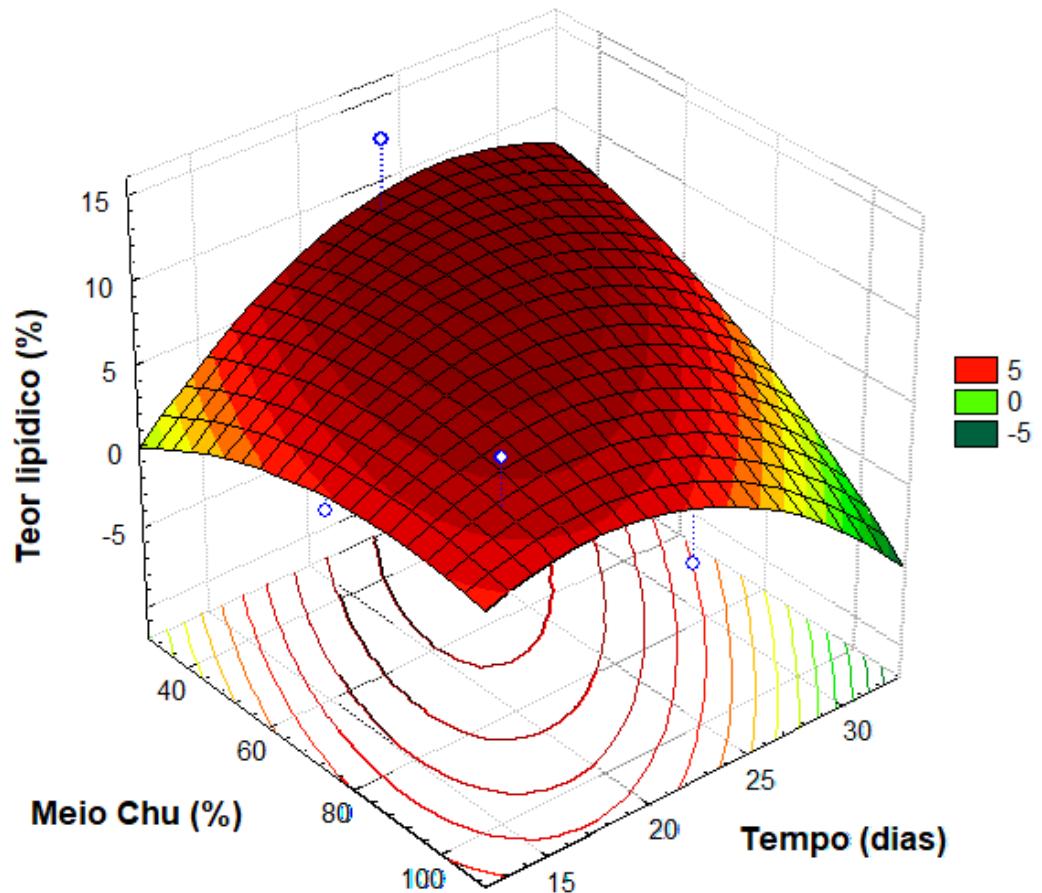
A estrutura matemática realizada a partir do planejamento composto central com 2 níveis, gerou uma superfície de resposta e curva de contorno (Figura 16), onde possibilitou observar que a máxima porcentagem de lipídeos alcançada indica uma menor concentração de meio Chu em um tempo estimado dentro das condições experimentais intermediário.

Na superfície de resposta, quando se tem uma região de máximo ou de mínimo, para se realizar um otimização é importante aplicar a derivada nesse modelo matemático em função de x e y, igualando a zero, encontrando assim a região de máximo da superfície de respostas, ou seja, a condição de tempo e meio de cultura que proporciona maiores porcentagens de lipídeos no experimento:

Para se obter uma determinada porcentagem de lipídeos, é necessário considerar as condições de x (meio Chu) e y (tempo-dias). Julgando os valores de x e y, através desse modelo matemático, foi possível construir o gráfico, que prediz como se comportou o experimento apresentando todas essas previsões.

Cada valor desse coeficiente que antecede x e y tem um significado, onde, quanto menor esse valor, menor a importância desse termo na equação. O meio Chu (-3,44) é mais importante que o tempo (+1,17), assim é possível prever como esse coeficiente influencia no teor de lipídeos. O sinal também tem importância, porque dependendo do meio nutricional, quanto maior for o percentual de Chu, menor vai ser o teor de lipídeos, por que equação apresentou um sinal negativo, o sinal positivo indica que quanto mais dias ficar maior é o teor de lipídeos.

Figura 16 – Superfície de resposta sendo influênciada pela variação de porcentagem nutricional em Meio Chu e tempo em dias



Fonte: próprio autor

Na Figura 16, é apresentado o gráfico de superfície de resposta que descreve o comportamento do acúmulo de lipídeos frente à influência das variáveis, concentração de meio Chu e tempo de cultivo em dias. Foi verificado que a concentração de nutrientes apresentou um eixo sobre a resposta, pois o acúmulo de lipídeos atinge um valor máximo quando a concentração inicial de meio Chu é de aproximadamente 39,5%. Verificou-se ainda que para valores inferiores ou superiores a este, o modelo prevê uma redução no acúmulo de lipídeos. Foi verificado também que a quantidade de dias (tempo) apresentou um ponto de máximo,

indicando a tendência de maior acúmulo de lipídeos em 20 dias de cultivo. Para essas condições de concentração inicial de meio Chu (39,5%) e tempo de cultivo (20 dias), o modelo prevê um acúmulo de teor lipídico de aproximadamente 9,74%.

Ao longo da fase de crescimento constante e multiplicação celular o processo nutritivo das microalgas reflete diretamente na constituição bioquímica, assim, porcentagens inferiores do meio nutricional disponíveis, possibilitam taxas mais elevadas de teor lipídico, devido a perda da multiplicação celular a qual concede o lugar ao acúmulo energético em forma de lipídeos (TREVISAN, 2019).

Logo, os ensaios que apresentaram concentrações inferiores de nutrientes disponíveis ao meio de cultivo, proporcionam maiores resultados no teor de lipídeos totais, devido ao decréscimo da multiplicação celular que possibilita o acúmulo de energia na forma de lipídeos, conforme mencionado por Trevisan (2019), o qual avalia a influência da concentração dos nutrientes, nitrogênio e fósforo, em suas condições experimentais, obtendo um rendimento de 12,7% à 17,9% de teor lipídico, demonstrando assim que a porcentagem lipídica é elevada, a medida que ocorre restrição nutricional.

Considerando que o custo com o meio nutricional de cultivo para microalgas é dispendioso, sendo um dos fatores limitantes sua produção e conversão em biodiesel, Baumgärtner (2011) realizou um experimento variando a concentração de meio nutricional, com o objetivo de obter uma relação ótima entre a diluição do meio e a produtividade da microalga, onde optou por seguir a metodologia de extração adaptada do método de Folch; Lees e Stanley (1956), obtendo 8,3% de lipídeos totais.

No que refere-se a produção de biodiesel por meio da utilização de biomassa microalgal, é indispensável que o cultivo apresente um alto rendimento lipídico, assim Guarieiro (2019), desenvolveu um metodologia com variação na concentração de nutrientes adicionando um efluente oriundo da produção de óleo de palma, com duração de 21 dias, alcançando uma produção 11,21% com $2,12 \text{ g L}^{-1}$ de conteúdo lipídico.

Ao variar a concentração do meio nutricional, com base em adição de um efluente oriundo de vinhaça, Guarieiro (2019), não registrou um teor de lipídeos totais expressivo (5,74%), sendo significativamente inferior ao obtido no presente estudo de 9,74%.

Microalgas associadas a três classes distintas (Chlorophyceae, Bacillariophyceae e Cyanophyceae), cultivadas em meio Chu padrão com adição de nitrogênio satisfatório para seu crescimento, demonstrou rendimentos de lipídeos totais variados (na faixa de 3 a 32%), onde o autor abordou a necessidade de relacionar os fatores físico-químicos e nutricionais frente ao comportamento metabólico (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

A porcentagem lipídica extraída dos experimentos em questão, se mostrou inferior (de 1,2 à 14,9), quando correlacionada com a literatura, onde a microalga *Scenedesmus*, por exemplo apresenta de 19,6 a 21,1% de lipídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Sendo necessário maior otimização das condições de cultivo empregadas, acredita-se que a ausência de aeração tenha sido um fator limitante, podendo evitar a sedimentação celular, mantendo o meio homogêneo, contribuindo para um rendimento mais promissor (BORGES, 2014).

7 CONCLUSÕES

Os processos biológicos a partir do cultivo de microalgas para produção de biodiesel, apresentam vantagens por serem competentes fixadoras de carbono atmosférico, controlando e prevenindo a poluição; no entanto, para uma produção competitiva é relevante baixar os custos com o meio de cultivo assim como otimizar os processos de colheita e extração lipídica.

Neste trabalho, variáveis foram avaliadas para estimar a melhor combinação metodológica, entre tempo de cultivo, porcentagem inicial de inóculo e meio nutricional.

Entre os resultados, de forma geral todos os experimentos apresentaram melhores rendimentos no teor lipídico, quando submetidos ao cultivo em meio Chu. No entanto, observa-se que o acúmulo de lipídeos atinge um valor máximo quando a concentração inicial de meio Chu é de aproximadamente 39,5%. Verificou-se ainda que a quantidade de dias (tempo) apresentou um ponto de máximo, indicando a tendência de maior acúmulo de lipídeos em 20 dias de cultivo. Para essas condições de concentração inicial de meio Chu (39,5%) e tempo de cultivo (20 dias), o modelo prevê um acúmulo de teor lipídico de aproximadamente 9,74%.

O processo adaptativo de microalgas, assim como o estudo das melhores interações entre as variáveis analisadas tem grande importância tecnológica, apresentando possibilidades de aumentar esse percentual lipídico através de metodologias que altere os padrões de cultivo, além de outras frentes de trabalhos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANP. **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

ARCEO, Á. A.; ARANDA, D. A. G. Q.; DÍAZ, R. T. A. Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. p. 204, 2012.

BATISTA, A. C. F. VIEIRA, A. T., RODRIGUES, H. S., BORGES, K.A., REZENDE, H. P ., PORTELA, F. M., CHIALASTRI, R. A., HERNANDEZ, M. G. T. Caracterização físico-química do biodiesel de pequi (*Caryocar brasiliensis*). **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 7, n. 1, p. 23–26, 2013. <https://doi.org/10.18011/bioeng2013v7n1p23-26>

BATISTA, A. C. F., VIEIRA, A. T., RODRIGUES, H. S., SILVA, T. A., ASSUNÇÃO, R. M. N., BELUOMINI, M. A., REZENDE, H. P ., HERNANDEZ, M. G. T.. Production and physicochemical characterization of methylic and ethylic biodiesel from canola oil. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 8, n. 4, p. 289–298, 2014. <https://doi.org/10.18011/bioeng2014v8n4p289-298>

BAUMGÄRTNER, T. R. DA S. **Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel**. [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Maringá, 2011.

BENEDITO, V. M.; PORTO, P. S. DA S.; FREITAS, R. R. DE. Modelagem do crescimento de microalgas: Um estudo bibliométrico. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2019. <https://doi.org/10.33448/rsd-v8i1.511>

BIBI, R. AHMAD, Z., IMRAN, M., HUSSAIN, S., DITTA, A., MAHMOOD, S., KHALID, A. Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. November 2015, p. 976–985, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.126>

BORGES, W. DA S. **Produção de bio-óleo empregando microalgas em diferentes meios de cultivo.** [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BRAGA, C. F. G. V.; BRAGA, L. V. Desafios da energia no Brasil : panorama regulatório da produção e comercialização do biodiesel. **Caderno EBAPE.BR**, v. 10, p. 751–762, 2012.

BRASIL, B. DOS S. A. F.; GARCIA, L. C. Agroenergia em revista: microalgas. **Embrapa Agroenergia**, v. Único, p. 6–11, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1679-39512012000300016>

CONCEIÇÃO, G. R., MARQUES, S. S. I., CABANELAS, I. T. D., ENCARNAÇÃO, J. P. DA., PEREIRA, S. A. Espécies de microalgas dulciaquícolas de ambientes naturais da Bahia , Brasil-Formação de Banco microalgas com potencial para biodiesel Espécies de microalgas dulciaquícolas de ambientes naturais na Bahia-Brasil : formação de um banco com potencial para s. n. January 2019, 2012.

COSTA, A. G. **Efeitos de diferentes condições físicas e efluentes agrícolas sobre o cultivo de microalgas da família scenedesmaceae como subsídio à aplicação biotecnológica.** [s.l.] Tese (Doutorado em Biologia Vegetal: Centro de Ciências Humanas e Naturais), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

COUGO, C. D. G. **Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em *Scenedesmus* sp.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia: Pesquisa e desenvolvimento de processos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

DE BHOWMICK, G., SUBRAMANIAN, G., MISHRA, S., SEN, R. **Raceway pond cultivation of a marine microalga of Indian origin for biomass and lipid production: A case study.** [s.l.] Elsevier B.V., 2014. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.07.005>

DELGADO, R. M. T. **Efeito da depleção de nitrogênio no crescimento , morfologia e composição bioquímica de *Picocystis salinarum* Lewin como matéria-prima para a produção de biodiesel.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal: Centro de Ciências Humanas e Naturais), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

DIAS, F. G. **Modelagem, ajuste e validação experimental do processo de geração de hidrogênio via cultivo de microalgas em fotobiorreatores compactos.** [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Materiais - PIPE), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

DURVASULA, R., HURWITZ, I., FIECK, A., RAO, D. V S. Culture, growth, pigments and lipid content of *Scenedesmus* species, an extremophile microalga from Soda Dam, New Mexico in wastewater. **Algal Research**, v. 10, p. 128–133, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.003>

DZUMAN, M. J. **Efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp para a produção de biodiesel.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), 2013.

EL SHIMI, H. I.; MOUSTAFA, S. S. Biodiesel production from microalgae grown on domestic wastewater: Feasibility and Egyptian case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. October 2008, p. 4238–4244, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.073>

ERAZO, R. G. T. P. **Isolamento, seleção e cultivo em meio sintético e vinhaça de microalgas com potencial para a produção de biodiesel.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2017.

ESPINOSA, L., TAPANES, N. DE LA C. ON., CRUZ, Y. R. As Microalgas Como Fonte De Produção De Biodiesel: Discussão De Sua Viabilidade. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 2, n. 1, p. 15–24, 2014. <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v2i1.58>

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 497–509, 1956. <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v2i1.58>

FONTOURA, J. T. DA. **Crescimento de microalgas em efluente de curtume : remoção de nutrientes , viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual.** [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia: Departamento de Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

FRANCO, A. L. C., LÔBO, I. P., DA CRUZ, R. S., TEIXEIRA, C. M. L. L., DE ALMEIDA, N. J. A., MENEZES, R. S. Biodiesel from microalgae: Progress and challenges. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>

GOES, H. H. D. **Estudo da produção de biodiesel catalisada por líquidos iônicos**. [s.l.] Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, 2018.

GONÇALVES, C. F. **Modelagem, simulação e otimização de cultivos autotróficos de Pseudoneochloris marina em fotobiorreatores airlift**. [s.l.] Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

GOUVEIA, L., GRAÇA, S., SOUSA, C., AMBROSANO, L., RIBEIRO, B., BOTREL, E. P., NETO, P. C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.010>

GUARIEIRO, M. DOS S. **Utilização da vinhaça no cultivo da microalga Klebsormidium flaccidum (Kützing) visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de biodiesel**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal - Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal,), 2019.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of marine invertebrate animals**, p. 29–60, 1975. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

GULDHE, A., SINGH, B., RAWAT, I., BUX, F. Synthesis of biodiesel from *Scenedesmus* sp. by microwave and ultrasound assisted in situ transesterification using tungstated zirconia as a solid acid catalyst. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1503–1511, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.05.012>

HAKALIN, N. L. S. Otimização das condições de cultivo da Microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel. p. 155, 2014.

KLEIN, A. P. **Avaliação de diferentes fotobiorreatores para cultivo de microalgas**. [s.l.] Trabalho de diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do

Sul, Porto Alegre, 2015.

LIU, Y., LAI, Y. J. S., BARBOSA, T. S., CHANDRA, R., PARAMESWARAN, P., RITTMANN, B. Electro-selective fermentation enhances lipid extraction and biohydrogenation of *Scenedesmus acutus* biomass. **Algal Research**, v. 38, n. November 2018, p. 101397, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101397>

LOPERA, J. E. P.; ALFARO, S. C. A.; MOTTA, J. M. S. T. Modelagem empírica da transferência goticular projetada em processos de soldagem GMAW. **Soldagem e Inspeção**, v. 17, n. 4, p. 335–346, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-92242012000400008>

LOPES, K.; MARTINS, E. M. A Potencialidade Energética da Biomassa no Brasil. **Revista Desenvolvimento Socioeconômico em Debate - RDSD**, v. 1, p. 94–106, 2019. <https://doi.org/10.18616/rdsd.v5i1.4829>

MARIANO, V. L. B. **Cultivo de microalgas em fotobiorretores**. [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Mídias Integradas na Educação), Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2011.

MCGINN, P. J. McGinn, Patrick J., PARK, K. C., ROBERTSON, G., SCOLES, L., MA, W., SINGH, D. Strategies for recovery and recycling of nutrients from municipal sewage treatment effluent and hydrothermal liquefaction wastewaters for the growth of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD. **Algal Research**, v. 38, n. September 2018, p. 101418, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101418>

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. [s.l: s.n.].

OCAMOTO, A. N., VIEIRA, B. R. D. R., ANTONIASSI, M. A., LEMES, P. M. P. **Indústria da produção de biodiesel**. [s.l.] Trabalho de Conclusão de curso (Engenharia Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, 2018.

OLIVEIRA, C. D. J. DE., Schaffner, R. De A., Cremonez, P. A., Feroldi, M., Teleken, J. G. Produção de Biodiesel a partir das algas: uma revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3,

p. 202–221, 2014.

PEDROTI, P. M. Os desafios do desenvolvimento e da inclusão social: O caso do arranjo político-institucional do programa nacional de produção e uso do Biodiesel. **Institute of Applied Economic Research (IPEA)**, 2013.

PENA, A. DE C. C., Fontoura, J. T. da., Trierweiler, L. F., Gutterres, M. Estudo de um consórcio de microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de curtume Resumo. **Revista Eletrônica Científica da UFRGS**, v. 4, p. 743–752, 2017.
<https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.743-752>

PEREIRA, M. V. N. L. **Cultivo de microalgas autóctones em efluente de reator anaeróbio: prospecção de cepas e efeito da taxa de diluição na produtividade de biomassa e tratamento terciário**. [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

QIN, C.; LEI, Y.; WU, J. Light/dark cycle enhancement and energy consumption of tubular microalgal photobioreactors with discrete double inclined ribs. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0214-8>

QIN, C.; WU, J. Influence of successive and independent arrangement of Kenics mixer units on light / dark cycle and energy consumption in a tubular microalgae photobioreactor. **Algal Research**, v. 37, n. September 2018, p. 17–29, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.020>

RAMIREZ, N. N. V. **Estudo Do Crescimento Da Microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia: Departamento de Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

RODRIGUES, L.; PIRES, T. A.; BATISTA, F. R. X. **Aplicação de efluente de soro de queijo no cultivo da microalga chlorella vulgaris**. [s.l.] Congresso Brasileiro de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2019. <https://doi.org/10.5151/cobecic2019-PBIO47>

SALOMÃO, I. L. Análise do programa nacional de produção e uso do biodiesel no Brasil

entre os anos 2005 e 2010: O papel dominante do biodiesel de soja. [s.l.] Tese (Doutorado: Programa de Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SANT'ANNA, C. L., TUCCI, A., AZEVEDO, M. T. DE P., MELCHER, S. S., WERNER, V. R., MALONE, C. F. DA S., ROSINE, E. F., RIOS, F., HENTSCHKE, GUILHERME S., OSTI, J. A. S., SANTOS, K. R. DE S., JUNIOR, W. A. G., ROSAL, C., ADAME, G. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras.** [s.l.] Instituto de Botânica, São Paulo, 2012.

SANTOS, A. Análise da toxicidade de água de rio contaminada com herbicida ametrina utilizando colunas de Winogradsky e microalgas como bioindicadoras. **Aleph**, p. 51 f., 2016.

SANTOS, B. **Redução Do Custo Da Produção De Biomassa Microalgal Como Matéria Prima Para Biodiesel.** [s.l.] Monografia (Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SANTOS, L. E. DA S. DOS. **Minimização De Emissões de Óxidos de Nitrogênio (NoX) pelo uso de fotocatálise e biofixação por microalgas.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais: Engenharia Química), Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2018.

SATI, H., MITRA, M., MISHRA, S., BAREDAR, P. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 38, n. January, p. 101413, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101413>

SHI, R.; HANDLER, R. M.; SHONNARD, D. R. Life cycle assessment of novel technologies for algae harvesting and oil extraction in the renewable diesel pathway. **Algal Research**, v. 37, n. November 2018, p. 248–259, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.005>

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, n. May 2017, p. 743–755, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.042>

SILVA, D. S. Participação e perspectivas das fontes renováveis e os seus impactos

provocados no sistema elétrico brasileiro. [s.l.] Projeto de Graduação (Escola Politécnica: Curso de Engenharia Elétrica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SILVA, D. A. DA. Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, 2014.

SILVA, G. C. DA., SANTOS, A. J. F. DOS., BREDDA, E. H., RÓS, P. C. M. DA. Otimização das condições de cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana* e caracterização do óleo obtido. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 6, p. 2730–2749, 2019.

SILVA, L. S. **Efeitos da luz UV no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp.** [s.l.] Trabalho de diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

SILVA, T. A., DE ASSUNÇÃO, R. M. N., VIEIRA, A. T., DE OLIVEIRA, M. F., BATISTA, A. C. F. Methylic and ethylic biodiesels from pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): Production and thermogravimetric studies. **Fuel**, v. 136, p. 10–18, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.035>

SIMIONATO, D., BASSO, S., GIACOMETTI, G. M., MOROSINOTTO, T. Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. **Biophysical Chemistry**, v. 182, p. 71–78, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.017>

SVENNING, J. B. SVENNING, J. B., DALHEIM, L., EILERTSEN, H. C., VASSKOG, T. Temperature dependent growth rate, lipid content and fatty acid composition of the marine cold-water diatom *Porosira glacialis*. **Algal Research**, v. 37, p. 11–16, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.009>

TAHER, D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais - Setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

TOMAS, C. **Cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em água de maceração do milho e**

extração e quantificação de lipídeos. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Bioenergia: Centro de Engenharias e Ciências Exatas), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2016.

TREVISAN, E. Avaliação termogravimétrica da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes condições nutricionais Thermogravimetric evaluation of the biomass of *Chlorella vulgaris* cultivated in different nutritional conditions. [s.l: s.n.]. <https://doi.org/10.22409/engevista.v21i2.22842>

VIDAL, I. C. DE A. Estudo da potencialidade de produção de biocombustíveis entre as microalgas *chlorella* sp. *Scenedesmus* sp. cultivadas em águas residuárias. [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, 2016.

VIEIRA, B. B. Indicadores de rompimento mecânico de células visando a extração de biocompostos de *Scenedesmus obliquus*. [s.l: s.n.].

XIAO, J., Liu, R., Yang, L., Hu, Q., Zhang, X. Macrofiltration-A leap towards high efficiency microalgal harvesting: A case study using *Scenedesmus acuminatus*. **Algal Research**, v. 37, n. June 2018, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.001>

XU, H., LEE, U., COLEMAN, A. M., WIGMOSTA, M. S., WANG, M. Assessment of algal biofuel resource potential in the United States with consideration of regional water stress. **Algal Research**, v. 37, n. September 2018, p. 30–39, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.002>

YADALA, S.; CREMASCHI, S. Design and optimization of artificial cultivation units for algae production. **Energy**, v. 78, p. 23–39, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.06.001>