



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



WITTER DUARTE GUERRA

AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS EMPREGANDO  
DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO EM *Scenedesmus* sp.

ITUIUTABA  
2019

WITTER DUARTE GUERRA

AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS EMPREGANDO  
DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO EM *Scenedesmus* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista

ITUIUTABA  
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 34, PPBIC				
Data:	11 de Setembro de 2019	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	<b>11:33</b>
Matrícula do Discente:	11712PGB008				
Nome do Discente:	Witter Duarte Guerra				
Título do Trabalho:	Avaliação do rendimento de biomassa e lipídeos empregando diferentes regimes de cultivo em <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, 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(às) 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 11:38, 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 11:38, 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 11:42, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1490889** e o código CRC **545B6B76**.

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

G934 Guerra, Witter Duarte, 1990-  
2019 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS  
EMPREGANDO DIFERENTES REGIMES DE CULTIVO EM  
Scenedesmus sp. [recurso eletrônico] / Witter Duarte Guerra. -  
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.2019.2439>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Biocombustível. I. Ferreira Batista, Antônio Carlos, 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

## DEDICATÓRIA

A toda minha família, em especial aos meus pais José dos Reis Guerra e Sônia Duarte Guerra, meus irmãos Jéssica Duarte Guerra, Wallas Duarte Guerra e Emanuelle da Silva Duarte, aos queridos amigos Recírio José Guerino, Flávia Costa e Jaqueline Chiesa pelo apoio permanente e incondicional sem o qual esse trabalho seria impossível.

A todos os professores que participaram e de alguma forma contribuíram na minha formação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e proteção.

Aos meus familiares, todo o meu amor e gratidão que mesmo longe sei que torceram por mim. Os meus pais, José dos Reis Guerra e Sônia Duarte Guerra por cuidarem de mim com tanto amor e prontidão. Aos meus irmãos Jéssica Duarte Guerra, Wallas Duarte Guerra e Emanuelle da Silva Duarte pelo apoio ao longo da minha jornada. Aos meus sobrinhos Davi Alves e Laura Alves que me alegraram quando estava triste ou cansado.

Ao Recírio Guerino que me ajudou, aconselhou, estimulou e contribuiu principalmente com a historicidade dos fatos.

A Flávia Costa e Jaqueline Chiesa pela amizade, companheirismo, pelos conselhos, pela parceria, pelas pesquisas durante o curso e na vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista (Flash), pelos conselhos, prontidão, paciência, orientação, estímulo e sobretudo pela confiança e oportunidades.

Aos professores Dr. Rosana Maria Nascimento e Dr. Anízio Márcio pelas dicas e aulas sobre estatística ao longo da pesquisa.

Ao professor Dr. Wesley da Silva Borges pela disponibilidade, atenção, cobrança, pela ajuda e pela contribuição na produção de conhecimento e orientação.

Aos colegas do curso e do CT INFRA que sempre estiveram dispostos em ajudar a todos os momentos em especial a Bárbara pelas viagens, confiança, dicas e conselhos.

A Isabela de Souza Dias por todo o suporte durante esses anos e disponibilidade em ajudar nos experimentos.

A querida e sempre atenciosa Andressa Tironi que sempre esteve pronta a ajudar, pelo apoio e disponibilidade.

A equipe de professores em especial ao Prof. Guimes pelo apoio e dicas construtivas e as reflexões durante as aulas e aos servidores da UFU – Uberlândia e UFU – Ituiutaba.

Ao curso de Química do Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara – ILES/ULBRA que nos deram todo o apoio necessário para o início dos experimentos com microalgas.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

“O mundo não se divide em pessoas boas e más. Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir; Isso é o que realmente somos!

Joanne Kathleen Rowling



## RESUMO

O uso de fontes renováveis para a produção de biocombustíveis vem crescendo a cada dia no mundo, essa intensa busca se deve principalmente aos problemas ambientais, associadas à queima de combustíveis fósseis. O esgotamento destas fontes como o petróleo e o carvão, tem impulsionado novas pesquisas por combustíveis derivados de fontes renováveis. Muitas microalgas podem ser utilizadas como matéria prima promissora para a produção de biodiesel devido à sua taxa elevada de crescimento e também por possuir altos rendimentos de lipídios, além de uma grande capacidade de crescer em diferentes ambientes. Desta forma o trabalho visa cultivar a microalga *Scenedesmus* sp., em diferentes regimes de cultivo e otimizar as melhores condições operacionais para produção de bio-óleo deste tipo específico de microalga. É relevante analisar estes dados que serão pesquisados, pois as microalgas tem um grande potencial na produção de biocombustíveis. Dessa forma, submeter as colônias de *Scenedesmus* sp. a ter uma aumento na produção de lipídeos otimizando os reatores e meios de cultivo podem aumentar o potencial de microalgas na produção de biodiesel. As microalgas foram cultivadas com diferentes regimes de cultivo como meio, luminosidade, reator, aeração e tempo de cultivo em batelada. Após o cultivo foram realizadas as extrações de óleo de cada reator utilizando o método de Folch. Após a realização do planejamento fatorial  $2^{5-1}$  e do planejamento composto central as melhores respostas foram obtidas a partir da definição das variáveis mais importantes no processo: reator horizontal, com meio de cultivo Chu, intensidade luminosa máxima, ou seja, três lâmpadas do tipo “luz do dia”, com 30 dias de cultivo, dotado de aeração, sem adição de vitaminas e controle de temperatura. A partir das ferramentas estatísticas os efeitos aeração, luminosidade e tempo, meio e luminosidade, apresentaram uma maior influência na produção de lipídeos em relação aos outros efeitos do planejamento fatorial. Em relação a otimização de Zn e Mn, utilizou-se  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  como fonte de zinco e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  como fonte de manganésio visto que ambos atuam na rota metabólica dos lipídeos. Após a otimização os valores de 130% de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  foi o mais eficaz resultando em 10,19% de teor de lipídeos.

**Palavras-chave:** Microalgas. Otimização. Produção.

## ABSTRACT

The use of renewable sources for biofuel production has been growing every day in the world, this intense search is mainly in environmental problems associated with the burning of fossil fuels. The depletion of these sources, such as oil and coal, has spurred new research into fuels derived from renewable sources. Many microalgae can be used as promising raw material for biodiesel production due to their high growth rates and also high lipid levels, as well as their high growth capacity in different environments. Thus, the work aims to cultivate a microalgae *Scenedesmus* sp., In different cultivation regimes and optimize as the best conditions for the production of bio-oil of this specific type of microalgae. It is relevant to analyze these data that will be researched, because microalgae is a great potential for biofuel production. Thus, submitted as colonies of *Scenedesmus* sp. an increase in lipid production that optimizes or recovers and culture media may increase the potential of microalgae in biodiesel production. As microalgae they were cultivated with different cultivation regimes as medium, luminosity, reactor, aeration and batch cultivation time. After cultivation they were performed as oil extractions from each reactor or Folch method. After performing the 25-1 factorial design and the central composite design, the best responses were initiated by changing the most important variables in the process: horizontal reactor, with Chu culture medium, maximum light intensity, ie, three measurements of the "Daylight" type, with 30 days of cultivation, endowed with aeration, without added vitamins and temperature control. From the statistical tools of the effects aeration, luminosity and tempo, medium and luminosity, it was detected a greater influence on the production of lipids in relation to the other effects of the factorial design. Regarding the optimization of Zn and Mn, use  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  as a source of zinc and  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  as a diagnostic source since both act on the lipid metabolic pathway. After optimizing 130%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  values, it was the most effective resulting in 10.19% lipid content.

**Keywords:** Microalgae. Optimization. Production.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema laminar de cultivo: superfície de cultivo, (A) represa (B) reservatório.....	10
Figura 2 - Frascos com 5L de cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	11
Figura 3 - Microscopia óptica com aumento de 40 vezes da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	14
Figura 4 - Formação de produtos a partir da biomassa de algas.....	16
Figura 5 - Unidade de cultivo. A – Sistema de cultivo desligado. B – Sistema de cultivo ligado. De acordo com o fotoperíodo 12/12 Luz/ Escuro.....	18
Figura 6 - Unidade experimental de cultivo.....	23
Figura 7 - Esquema da unidade experimental de cultivo.....	25
Figura 8 - Cultivo de microalgas com meio Guillard.....	25
Figura 9 - Composição do Chu para o cultivo de microalgas.....	26
Figura 10 - Reatores verticais com regimes diferentes de aeração: reator A sem o sistema de aeração, reatores B com sistemas de aeração.....	28
Figura 11 - Ilustração esquemática de um espectrocópio de absorção molecular na análise do meio de cultivo da microalga.....	30
Figura 12 - Determinação da biomassa seca.....	30
Figura 13 - Procedimento inicial para determinação da quantidade de óleo e lipídeos: maceração da biomassa com reagentes específicos (A), processo de banho e centrifugação do material obtido (B).....	31
Figura 14 - Procedimento para determinação da quantidade de óleo e lipídeos.....	32
Figura 15 - Procedimento final de extração de óleo: filtração com sulfato de sódio anidro (A) e evaporação dos solventes em uma capela de exaustão (B).....	33
Figura 16 - Crescimento das microalgas em diferentes dias de cultivo.....	35
Figura 17 - Curva de inóculo para crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. 15 dias de cultivo – Reator 1.....	35
Figura 18 - Curva de inóculo para crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. 30 dias de cultivo – Reator 16.....	36

Figura 19 - Curva de inóculo para crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. 15 dias de cultivo – Reator 4.....	37
Figura 20 - Reator horizontal sem aeração (A) e reator vertical dotado de aeração (B).....	38
Figura 21 - Curva de inóculo para crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. 30 dias de cultivo – Reator 10.....	38
Figura 22 - Gráfico normal de efeitos para a produção de lipídeos em cultivo de microalgas.....	43
Figura 23 - Superfície de resposta para teor de lipídeos em relação a concentração de Zinco em Manganês.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biocombustíveis e as principais fontes de matérias-primas. Fonte: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social.....	6
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudadas no crescimento de microalgas ( <i>Scenedesmus</i> sp.).....	19
Tabela 3 -Matriz de planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}$ .....	20
Tabela 4 – Matriz do planejamento composto central.....	21
Tabela 5 – Valores de concentrações de sulfato de zinco hepta-hidratado e cloreto de manganês tetra hidratado do planejamento composto central.....	22
Tabela 6 -Composição do meio Guillard modificado.....	24
Tabela 7- Composição do meio Chu.....	26
Tabela 8 - Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para <i>Scenedesmus</i> sp.....	40
Tabela 9 -Porcentagem de lipídeos de acordo com o planejamento fatorial $2^{5-1}$ .....	41
Tabela 10 - Resultados para a biomassa seca, quantidade de óleo produzida e teor de lipídeos extraído das células para <i>Scenedesmus</i> sp.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

EIA - Energy Information Administration

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

UBRABIO - União Brasileira de Biodiesel e Bioquerosene

TL - Teor de lipídeos

MO - Massa de óleo produzida

CB - Concentração da biomassa

SMA - Solução de Macronutrientes

SMI - Solução de Micronutrientes

MA - Média Aritmética

CO<sub>2</sub> - Gás Carbônico

% - Por cento

kJ - Quilo joule

kg – Quilograma

Pa – Pascal

°C - Graus Celsius

ha – Hectare

L – Litro

pH – Potencial hidrogeniônico

nm – Nanômetro

g/L – Gramas por litro

h – Horas

mL – Mililitro

V – Volt

lx – Lux

UV – Radiação ultravioleta

g – Grama

kHz – Quilo Hertz

rpm – Rotações por minuto

KCl – Cloreto de Potássio

PCC – Planejamento composto central

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 – OBJETIVOS</b>	3
2.1 – Objetivo geral	3
2.2 – Objetivos específicos	3
<b>3 – REFERENCIAL TEÓRICO</b>	4
3.1 - Combustíveis fósseis	4
3.2 – Biocombustíveis	5
3.2.1 – Biodiesel	6
3.3 – Microalgas	8
3.3.1 – Classificação das microalgas	9
3.4 – O cultivo de microalgas	9
3.4.1 – Sistemas de cultivo	9
3.4.1.1 – Sistema de cultivo aberto	10
3.4.1.2 – Sistema de cultivo fechado	10
3.5 – Fatores de crescimento das microalgas	11
3.5.1 – Temperatura	11
3.5.2 – Luz	12
3.5.3 – Aeração	12
3.5.4 – pH	12
3.5.5 – Nutrientes	13
3.5.5.1 – Macronutrientes	13
3.5.5.2 – Micronutrientes	13
3.6. – <i>Scenedesmus</i> sp	14
3.2.3 - Biocombustíveis a partir de microalgas	14
<b>4– METODOLOGIA</b>	18
4.1 – Microalgas	18
4.2 – Planejamento estatístico	19
4.2.1 – Planejamento composto central (PCC)	21
4.3 – Unidade experimental para o cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp	23
4.3.1 – Meio de cultivo Guillard (1975) para <i>Scenedesmus</i> sp	24
4.3.2 – Meio de cultivo Chu para <i>Scenedesmus</i> sp	24
4.4 – Avaliação dos cultivos	27



4.5 – Regimes de cultivo.....	27
4.5.1 – Idade do inóculo.....	27
4.5.2 – Cultivo laboratorial de microalgas em reatores cobertos.....	27
4.5.3 – Aeração em sistemas de cultivo de microalgas.....	28
4.5.4 – Variação de nutrientes por diferentes meios de cultivo.....	28
4.5.5 – Cultivo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. com diferentes intensidades luminosas.....	29
4.6 – Métodos analíticos.....	29
4.6.1 – Avaliação de crescimento e biomassa através de espectroscopia.....	29
4.6.2 – Determinação do peso seco da biomassa.....	30
4.6.3 – Quantidade de óleo e teor de lipídeos.....	31
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>34</b>
5.1 – Modelo experimental 1.....	34
5.1.1 - Geração de biomassa a partir do crescimento celular.....	34
5.1.2 – Comportamento da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo.....	39
5.2 – Modelo experimental 2 – Planejamento composto central 2 <sup>2</sup> (PCC).....	43
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

Atualmente pesquisadores têm se preocupado com as questões ambientais devido a alguns fatores de grande importância, um deles se refere ao imenso consumo de combustíveis fósseis para alimentar a necessidade de energia que tem gerado grandes problemas ambientais (PERIN *et al.*, 2015).

Com o acelerado consumo de energia, a necessidade de outras formas de energia se torna necessária, sendo assim, fontes alternativas de energia tem sido pesquisadas em todo o mundo para que dessa forma possa se encontrar uma solução para tal problema.

A busca por fontes que podem ser consideradas renováveis para a produção de biocombustíveis vem crescendo a cada dia no mundo, essa busca da sociedade se deve principalmente a problemas ambientais, como as emissões de gases que são oriundos da queima de combustíveis fósseis. Além disso o fornecimento limitado de combustíveis não renováveis como o petróleo exigem novas descobertas de fontes alternativas que devem ser renováveis e sustentáveis (HU *et al.*, 2008).

Dessa forma, os biocombustíveis a partir de algas (ou microalgas) surgem como uma nova alternativa, ganhando espaço no mercado, por questões benéficas como: sustentabilidade, fácil reprodutibilidade e natureza favorável ao cultivo. A partir da biotecnologia, a produção e metodologias eficazes ajudarão os biocombustíveis a provar sua maturidade como fonte sustentável, onde a cultura de algas depende da eficiência com que convertem a luz solar em biomassa e lipídeos (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

Visando esse excedente, o presente trabalho visa cultivar uma espécie de microalga *Scenedesmus* sp. objetivando-se a produção de lipídeos empregando diferentes regimes de cultivo. Seria, dessa forma uma das alternativas para que se possam reduzir a dependência dos combustíveis fósseis a utilização dos óleo de microalgas e sua biomassa para diversas utilidades.

É relevante analisar estes dados que foram pesquisados, pois as microalgas tem um grande potencial na produção de biocombustíveis. Dessa forma, submeter as colônias de *Scenedesmus* sp. a um aumento na atividade metabólica de lipídeos pode aumentar o potencial de microalgas na produção de biodiesel.

Acredita-se que submeter as colônias de *Scenedesmus* sp. a diferentes meios de cultivo possam trazer resultados positivos como o aumento no metabolismo de lipídeos e biomassa, testando diferentes meios de cultivo, reatores, tempo, luminosidade e aeração afim de analisar, comparar e otimizar as melhores condições de cultivo para *Scenedesmus* sp.

visando aumentar o teor de lipídeos produzido.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

Otimizar a produção de biomassa e lipídeos da microalga *Scenedesmus* sp. em diferentes regimes de cultivo.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Definir os melhores parâmetros de cultivo para a *Scenedesmus* sp. Como tipo de reator, meio, aeração, luminosidade e tempo de cultivo para rendimento de biomassa e lipídeos.
- Identificar o melhor tempo de cultivo para rendimento de biomassa e lipídeos.
- Avaliar se a microalga *Scenedesmus* sp. É capaz de sintetizar maior quantidade de lipídeos.
- Verificar a viabilidade da produção de biodiesel a partir do óleo da *Scenedesmus* sp.
- Avaliar os principais fatores que afetam a produção de lipídeos pela *Scenedesmus* sp. a partir de um planejamento fatorial fracionário.
- Otimizar a produção de lipídeos, empregando um planejamento estatístico controlando os fatores selecionados.

### 3 – REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 - Combustíveis fósseis

Os combustíveis fósseis são combustíveis derivados de origem mineral, são considerados materiais não renováveis, ou seja, demoram anos para serem produzidos. Desta forma, muitos pesquisadores tentam encontrar formas para substituir os combustíveis fósseis por outros tipos de combustíveis (GOLDENSTEIN; AZEVEDO, 2006).

Villela (2014) e Batista *et al.* (2014) afirmam que de acordo com algumas previsões em um futuro muito próximo as reservas de petróleo acabarão completamente isso porque, desde o final deste século o petróleo tem sido a principal fonte de energia no mundo, porém o esgotamento das reservas e a preocupação com a intensificação de problemas ambientais ocasionados pela queima de combustíveis fósseis, tem evidenciado a necessidade da busca por fontes de energias limpas e renováveis.

Atualmente há uma grande demanda mundial de energia e a maior parte desta produção provém do petróleo, do carvão e do gás natural. No entanto, estas fontes são limitadas e com previsão de se esgotarem em um futuro muito próximo, desta forma vê-se a necessidade da busca por fontes alternativas de energia, onde o biodiesel aparece como uma boa alternativa para esta demanda mundial de energia renovável (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005). Islam, Heimann, Brown, (2017) afirmam, que com o elevado crescimento populacional e industrial a demanda energética deve aumentar gradativamente chegando a 50% ou mais até 2030.

O esgotamento destas fontes como petróleo e o carvão, tem impulsionado novas pesquisas por combustíveis derivados de fontes renováveis. Como exemplo tem-se o biodiesel, um combustível não fóssil, o qual pode substituir total ou parcialmente o diesel de petróleo em motores de ciclo diesel, sem a necessidade de qualquer adaptação (GAMA; GIL; LACHTER, 2010).

Segundo projeções da Energy (U.S. EIA, 2019) o consumo mundial total de energia deverá aumentar até 49% em 2035. Este cenário mostra que é necessário a busca e diversificação da matriz energética do mundo por meio e uso de fontes renováveis de geração de energia limpa, através de processos que possam ter um desenvolvimento econômico e sustentável.

Suprir a demanda energética mundial tem sido um grande desafio para nossa sociedade. A contínua elevação do preço do barril de petróleo e as questões ambientais

associadas à queima de combustíveis fósseis também têm contribuído para colocar a humanidade frente à necessidade de novas fontes energéticas (RUSCHEL, 2010). Portanto, há vigorosas iniciativas de pesquisa voltadas para o desenvolvimento de biocombustíveis alternativos renováveis, potencialmente neutros, sólidos, líquidos e gasosos como recursos energéticos alternativos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

### 3.2 – Biocombustíveis

Os biocombustíveis são uma boa alternativa para resolver os problemas sobre a deficiência energética mundial que pode ocorrer futuramente, pois eles são produzidos a partir da biomassa. Sendo assim pode se considerar também como uma boa alternativa pois diminuem problemas ambientais e energéticos, evitando assim a redução da emissão de poluentes por serem considerados fontes renováveis (SALOMÃO, 2013).

Biocombustíveis são combustíveis, produzidos a partir de material orgânico para motores de explosão, estes tipos de combustíveis estão ganhando um grande espaço no Brasil e no mundo, já que os álcoois e ésteres são substitutos diretos aos combustíveis fósseis que podem ser facilmente produzidos em escala significativa. Os biocombustíveis mais comuns utilizados regularmente no mundo são o etanol da cana-de-açúcar, milho e beterrada, e o biodiesel advindo de óleos vegetais (SALOMÃO, 2013).

A preocupação com as questões ambientais tem se tornado cada vez mais frequentes, essa preocupação se dá porque os processos produtivos atuais exploram incansavelmente os recursos naturais, provocando danos ao meio ambiente e levando a escassez desses recursos (VILLELA, 2014).

Elrayies (2018) e Doshi *et al.*, (2016) afirmam que os biocombustíveis são uma ótima alternativa para substituir os combustíveis, onde estes podem ser categorizados em três diferentes gerações que dependem exclusivamente da tecnologia que foi empregada para a sua produção. A geração 1G (Primeira geração) é definida como a geração a partir de produção de culturas como milho, cana-açúcar e soja. A geração 2G (segunda geração) é aquela que utiliza matérias-primas lignocelulósicas ou resíduos do petróleo e do óleo de cozinha residual. A geração 3G (Terceira geração) é descrita como aquelas que não utilizam o solo, e mesmo assim produzem matérias-primas, compreende a 3ª geração a utilização de microrganismos fotossintetizantes, como as microalgas.

Diversas culturas atualmente vem sendo utilizadas para a produção de biocombustíveis (Tabela 1) como a soja, mamona, milho, girassol, dentre outras. Todavia com

o aumento da demanda por produtos para produção de biocombustíveis e sua competição com os alimentos (humano ou animal), os preços tendem a subir o que evidencia a presente busca por fontes renováveis não alimentícias de combustíveis renováveis (LEITE; LEAL, 2007).

Tabela 2: Biocombustíveis e as principais fontes de matérias-primas. Fonte: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (2008).

Biocombustível	Matéria-prima	Redução na emissão de gases de efeito estufa	Custo de produção	Produção de biocombustível por hectare	Terras utilizadas
Bioetanol	Grãos (trigo, milho)	Moderado a baixo	Moderado	Moderado	Terras férteis
Bioetanol	Cana-de-açúcar	Alto	Baixo	Alto	Terras férteis
Biodiesel	Óleos de sementes (canola, soja, etc.)	Moderado	Moderado	Baixo	Terras férteis
Biodiesel	Óleo de palma	Moderado	Moderado a baixo	Moderado	Terras litorâneas e úmidas

Desde então tem se despendido uma grande quantidade de recursos e estudos para o desenvolvimento de técnicas que busquem a redução de gases do efeito estufa. Uma das alternativas abordadas pelos pesquisadores seria a obtenção de energia através de plantas ou seres que fixam CO<sub>2</sub>, assim gerando outros produtos de alto valor agregado. Um destes produtos é o bio-óleo, que através de um processo bioquímico, pode ser convertido em biodiesel (FERNANDES *et al.*, 2008).

### 3.2.1 – Biodiesel

O biodiesel é produzido a partir de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, para serem utilizados em motores de ignição por compressão, também conhecidos como motores diesel (BATISTA *et al.*, 2014).

Nessa perspectiva, Osaki, Batalha, (2008), definem biodiesel como um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, onde sua constituição se baseia em uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos obtidos pela transesterificação de quaisquer triglicerídeos com álcool de cadeia curta, metanol ou etanol. Os tipos de óleos para sua produção podem ser de fonte animal ou vegetal. De fonte animal são as gorduras animais, resíduos industriais e domésticos, enquanto as principais fontes vegetais são os óleos de soja, girasol, amendoim, colza, canola, algodão, entre outros.

A utilização do biodiesel já tem atualmente aplicação de biomassa para produção de energia, pois apresenta vantagens sobre o diesel de petróleo, pois não é tóxico e é proveniente de fontes renováveis, além de uma menor quantidade em taxa de emissão durante o processo de combustão. O biodiesel apresenta uma quantidade de energia cerca de 10% menor que o diesel de petróleo e seu desempenho no motor é praticamente o mesmo no que diz respeito à potência e ao torque (LÔBO; FERREIRA, 2009).

A produção agrônômica brasileira se baseia em algumas culturas principais de soja, algodão, palma, mamona, amendoim e milho, sendo o último utilizado cem por cento para alimentação. A destinação das demais oleaginosas citadas foram cotadas como elegíveis para a produção de biodiesel (OSAKI; BATALHA, 2008).

A principal matéria prima para produção de biodiesel atualmente é a soja, mas ela apresenta baixa produtividade de óleo em torno de 20% o que demonstra que futuramente esta matéria prima deva ser substituída por outra mais viável e que dê um maior retorno financeiro e químico. Pesquisas no Brasil ainda demonstram que o óleo de dendê e o óleo de palma apresentam um rendimento muito maior em produtividade oleaginosa do que a soja. O que ainda impede essa produção é a falta de conhecimento agrônômico destas espécies e longo prazo para a sua produção (OSAKI; BATALHA, 2008).

Atualmente, o custo de produção do Biodiesel, a partir de óleos vegetais, supera o preço do diesel mineral ou diesel fóssil, já que no mercado houve uma explosão de preços dos óleos vegetais, o que inviabiliza a sua produção. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2018), com uma matéria prima como a soja no Brasil ainda é inviável a produção em escala industrial de biodiesel.

A poluição causada pelos combustíveis é um assunto que vem preocupando a todos durante muitos anos, e como o consumo dos mesmos também vem nesta mesma crescente, o aumento dos gases poluentes na atmosfera se tornam preocupantes. Dessa forma, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) determinou que a partir de 2005 iria se formar uma mistura de 2% de biodiesel no diesel. Neste sentido, Batista, Pereira e Vieira (2012), afirmam que os combustíveis que são utilizados em motores diesel podem ser parcial ou totalmente substituídos por biocombustível. O combustível diesel contendo 2%, 5% e 10% de biodiesel é chamado B2, B5 e B10, respectivamente, e o biodiesel puro é chamado B100.

O PNPB indicou um projeto que se tornou a lei 11097/ 2005 em que a mistura de biodiesel ao diesel se faz necessária na matriz energética brasileira. O PNPB ainda definiu as responsabilidades de licenciamento e fiscalização para a ANP. Em janeiro de 2005, a medida se tornou autorizativa e, a partir de 2006, ela se tornou obrigatória.



Atualmente, o preço do biodiesel é muito superior ao do diesel fóssil, ou seja, sua produção ainda necessita de melhores metodologias além de matéria prima barata e altamente produtiva. O preço do biodiesel é definido pelos leilões de biodiesel, que acontecem mais de uma vez ao ano, e definem a partir de lances e ofertas os valores e estratégias de compra para biodiesel. A compra deve ser realizada para que as empresas possam incluir a porcentagem ideal e legal, e posteriormente, a ANP fiscalizará as empresas que estão credenciadas a comprar biodiesel (ANP, 2018).

### 3.3 – Microalgas

As microalgas são microorganismos microscópicos que podem medir 5-50  $\mu\text{m}$ , são seres fotossintetizantes que utilizam a luz e compostos inorgânicos como, fosfato e nitrogênio, além do  $\text{CO}_2$ , para a produção de metabolitos de interesse (YU; CHEN; ZHANG, 2015).

Lubiana (2014) estabelece, que as algas tem algumas características específicas como não apresentar diferenciação quanto à caule, folhas e raízes, ou seja, são talófitas, além de ter a ausência de órgãos reprodutores com exceção aos multicelulares. Em relação ao habitat elas podem ser encontradas em locais de água doce, salgada ou até mesmo no solo em associação com fungos. São organismos fotossintetizantes e que, em geral, possuem o pigmento clorofila A.

Já Hu *et al.*, (2008) e Brennan; Owende (2010) definem as algas como um grupo extremamente diverso de organismos simples, uni ou pluricelulares, autotróficos, fotossintetizantes e que ocorrem em diferentes habitats, predominando em ambientes de água doce ou salgada. São conhecidas como uma das mais antigas formas de vida do planeta, definindo-se como microrganismos fotossintetizantes que crescem rapidamente em diferentes condições ambientais devido à sua estrutura celular simples.

Porém, Santos (2018) e Oliveira (2013) apresentam algumas características que também podem definir as microalgas como o habitat em solos, fisiologicamente podem ser procarióticos ou eucarióticos, podendo variar seu tamanho e forma.

Ainda, Oliveira (2013) comenta que as microalgas são compostas basicamente de proteínas, carboidratos, vitaminas e lipídeos.

Dentre os organismos fotossintetizantes encontrados hoje no meio ambiente, aqueles que apresentam características como crescimento celular rápido são as algas, que podem chegar a consumir cerca de duas toneladas de  $\text{CO}_2$  para produzir até uma tonelada de biomassa (MALLICK *et al.*, 2012)

Juárez *et al.* (2016), afirma que a biomassa das microalgas é composta por 7%-23% de carboidratos, 5%-23% de lipídeos e 6-52% de proteínas. A alteração desses valores pode sofrer variação devido a espécie analisada e as condições de cultivo como, a privação de nutrientes.

Lubiana (2014) afirma que as algas (e microalgas) são classificadas no domínio Procariota e dividem-se em Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta, Charophyta, Ochrophyta, Dinophyta/ Pyrrophyta, Cercozoa, Cryptophyta, Haptophyta, Euglenozoa. Tendo mais de 50 Classes diferentes e mais de 4 milhões espécies hoje conhecidas.

As microalgas estão presentes em um grupo muito distinto com características que as favorecem para a produção de muitos produtos em seu próprio metabolismo como o bio-óleo. Porém, vale resaltar que há muitas espécies diferentes, e que essa variação fisiológica e morfológica vai interferir diretamente nas aplicações de cada espécie diferente de microalga (MENEZES *et al.*, 2013).

### 3.3.1 – Classificação das microalgas

Atualmente as algas são divididas em três grupos principais: microalgas, cianobactérias e macroalgas (PIRES, 2017), porém não existe um sistema de classificação totalmente claro pois a taxonomia está sob constante revisão em todos os níveis seguindo novas evidências genéticas e estruturais (CARTAS, 2018).

Vários biólogos vem a alguns anos categorizar as microalgas em uma grande variedade de classes, eles fazem essa classificação de acordo com a sua pigmentação, ciclo de vida, reprodução, tecidos verdadeiros e estrutura celular básicas. Dentre os três grupos estudados as microalgas se destacam como o grupo mais estudado para a produção de biocombustíveis (PIRES, 2017).

## 3.4 – O cultivo de microalgas

Nesta seção serão apresentadas as principais formas de cultivo para microalgas, suas vantagens e desvantagens.

### 3.4.1 – Sistemas de cultivo

Qin, Lei, Wu (2018) afirmam que os sistemas de cultivo de microalgas são baseados

em lagoas abertas (Figura 2–A/B) em fotobiorreatores fechados (Figura 3) e a viabilidade de cada sistema é baseado na espécie escolhida a ser cultivada. As microalgas geralmente são cultivadas em fotobiorreatores/ reatores que são sistemas fechados que proporcionam um ambiente mais protegido de contaminações do que as lagoas abertas e, assim, podem possibilitar um maior rendimento por área e volume, além de obter cultivos com maior grau de pureza.

#### 3.4.1.1 – Sistema de cultivo aberto

O sistema de cultivo aberto pode ser feito de várias formas, em lagoas abertas, *raceways*, em tanques entre outros. O grande desafio para este tipo de sistema é a baixa produtividade, contaminação e pouco controle das variáveis ambientais. Entre as vantagens, o baixo custo, a facilidade de limpeza e a baixa demanda de energia (BRENNAN; OWENDE, 2010).

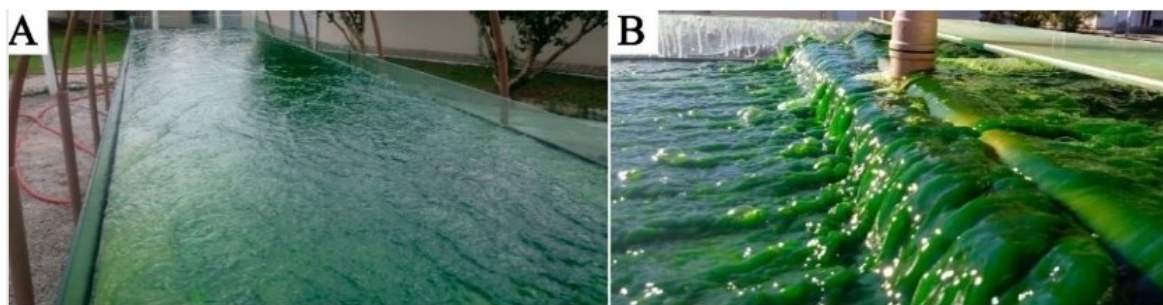


Figura 1: Sistema laminar de cultivo: superfície de cultivo, (A) represa (B) reservatório (VENÂNCIO, 2016).

#### 3.4.1.2 – Sistema de cultivo fechado

Como grande desafio para os pesquisadores que utilizam os sistemas de cultivo fechados estão a exposição de todas as células igualmente a iluminação artificial, ou seja, é necessária a movimentação desse meio para que todas as células sejam iluminadas uniformemente (VENÂNCIO, 2016).



Figura 2: Frascos com 5L de cultura de *Scenedesmus obliquus* (VENÂNCIO, 2016)

Entre as vantagens estão o controle das atividades, boa passagem de luz e baixa taxa de contaminação. Entre as desvantagens deste tipo de cultivo estão, acúmulo de biomassa nas paredes, sistema ainda muito caro e exigência de equipamentos sofisticados (BRENNAN; OWENDE, 2010).

### 3.5 – Fatores de crescimento das microalgas

Alguns fatores podem influenciar no crescimento de microalgas entre eles estão a temperatura, luz, aeração, pH e os nutrientes. Uma temperatura ótima para a fotossíntese cresce com aumento da intensidade luminosa. Se os fatores estiverem satisfatórios, as microalgas podem ter sua atividade metabólica e produção máximas alcançada (OLIVEIRA, 2013).

#### 3.5.1 – Temperatura

A temperatura é um fator que tem grande influência no crescimento das microalgas, ela se refere na velocidade de algumas reações químicas como fotossíntese e respiração celular. Ohse, Derner, Ozório (2008) afirmam que a temperatura ótima para o crescimento de microalgas é em torno de 20°C-35°C e que, com as condições específicas de nutrientes e luz, elas podem ter uma taxa ótima de crescimento. Nesse sentido, Su *et al.*, (2017), afirma que o aumento da temperatura acarreta o aumento no teor de proteínas e uma diminuição no teor de lipídios e carboidratos celular.

A temperatura pode também alterar a morfologia das células em algumas espécies como do gênero *Chlorella* que podem suportar uma temperatura de até 42°C (CARTAS,

2018).

### 3.5.2 – Luz

Uma das condições que podem influenciar no desenvolvimento das microalgas é a luminosidade ou intensidade luminosa, em especial, o comprimento de onda e a duração do mesmo. Em cultivos laboratoriais, a intensidade luminosa é controlada e as lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”, que são as mais indicadas, pois tem comprimento de onda de 350 a 700 nm (OLIVEIRA, 2013).

A quantidade de energia luminosa, em cultivo laboratorial de microalgas pode ser um fator limitante na produção de biomassa e crescimento celular, visto que, a alta incidência luminosa causa a fotoinibição, que reduz o crescimento celular em função da exposição excessiva da luz, que dessa forma cessa a taxa fotossintética (FRANCO *et al.*, 2013).

Oliveira (2013) e Borges (2014) afirmam que o sistema de iluminação em ambientes controlados normalmente é dotado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

### 3.5.3 – Aeração

A escolha dos sistemas de cultivo é outro aspecto-chave que afeta significativamente a eficiência e o custo-benefício do processo de produção de biocombustível a partir de microalgas (LI *et al.*, 2008).

Em um sistema de cultivo de microalgas, a aeração é um processo importante para homogeneizar o meio de cultivo com as microalgas. Ela ajuda no controle de temperatura, transferência de gases, incidência luminosa e ainda pode ser considerada como ótimo parâmetro para se controlar a atividade fotossintética (CARTAS, 2018).

### 3.5.4 – pH

O pH pode interferir diretamente no metabolismo das microalgas, afirma Wojciechowski *et al.* (2013), pois a maior parte dos ambientes aquáticos apresentam um pH entre 6 e 9, e as variações de pH em um sistema de cultivo de microalgas podem modificar o estado químico de várias substâncias importantes para as microalgas. Além disso, outros fatores podem atuar negativamente com a alteração do pH como, permeabilidade da membrana, transporte iônico e velocidade das reações químicas.

A brusca alteração de pH, abaixo de 6 ou acima de 9, torna o meio de cultivo impróprio para as microalgas, causando a indisponibilidade de nutrientes (DERNER *et al.*, 2006).

### 3.5.5 – Nutrientes

Os nutrientes são de grande importância para o cultivo de microalgas e algas em diferentes tipos de reatores. Salama *et al.*, (2017), afirma que cada um dos componentes que fazem parte do meio de cultivo tem uma função específica para o metabolismo destes seres vivos. Desta forma, os nutrientes são de vital importância para sua cultura. Alguns elementos são considerados como fundamentais em praticamente todos os sistemas de cultivo com microalgas, são eles: carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco e molibdênio.

#### 3.5.5.1 – Macronutrientes

Os macronutrientes são aqueles nutrientes necessários para as biomoléculas, no meio intra e extracelular. Os principais macronutrientes utilizados em culturas de microalgas são, o oxigênio que atua nas atividades respiratórias, o fósforo que é envolvido nas trocas gasosas, o silício que atua no esqueleto externo, entre outros como carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, sódio, potássio e cálcio (SALAMA *et al.*, 2017).

#### 3.5.5.2 – Micronutrientes

Salama *et al.*, (2017), afirmam que alguns nutrientes são de grande importância para o seu crescimento, são eles: o ferro, cobre, manganês, zinco, cloro, vanádio, molibdênio, boro, cobalto e silício

Borges (2014) fez um estudo detalhado sobre a importância de determinados micronutrientes e sua relação com o rendimento de bio-óleo em reatores fechados do tipo bandeja. Dentre os micronutrientes de fundamental importância para o cultivo de microalgas o manganês, zinco, cobre, molibdênio, cálcio e selênio mereceram destaque em seu estudo.

### 3.6. – *Scenedesmus* sp.

O gênero *Scenedesmus* é muito utilizado quando o assunto é bioenergia. Esta microalga vive em água doce mas também pode ser encontrada em águas salobras, de forma menos frequente. São indivíduos clorofilados e unicelulares e podem formar colônias com um agrupamento de células de 4-8 raramente mais do que essa quantidade (OLIVEIRA, 2013). Atualmente é muito utilizada pela sua grande quantidade de bio-óleo produzida e pela sua biomassa.



Figura 3: Microscopia óptica com aumento de 40 vezes da microalga *Scenedesmus* sp. (OLIVEIRA, 2013).

Segundo Oliveira (2013) e Borges (2014) o gênero *Scenedesmus* tem como grande característica o teor de lipídeos que pode variar de 10% a 20% quando cultivada em condições apropriadas, mas quando há uma otimização dos padrões de cultivo esse teor de lipídeos pode ser superior a 30%.

A característica do alto teor de lipídeos na *Scenedesmus* sp. deixa esta microalga como uma das elegíveis para a produção em grande escala de biodiesel. Para isso, é necessário que o cultivo seja em tanques, de preferência como sistemas fechados para que não haja contaminação (BORGES, 2014) e (VENDRÚSCOLO, 2009).

### 3.2.3 - Biocombustíveis a partir de microalgas

O petróleo vem se tornando cada vez mais ultrapassado, quando se pensa em geração de energia e depois de ser usado o milho, cana-de-açúcar, mamonas entre outros, para a produção de biocombustíveis, os cientistas indicam que o futuro das fontes energéticas podem

estar em mares e rios. Algumas algas tem a capacidade de fabricar, naturalmente, a matéria-prima de combustíveis fósseis como o óleo e a gasolina (ANGELO, 2016).

Entre as possibilidades atuais para a produção de biocombustíveis, o uso de microalgas é visto como fonte viável de biomassa e tem causado grandes expectativas no setor energético. As algas atualmente são utilizadas para produção de suplemento alimentar e também para extração de compostos de alto valor agregado. Elas podem ser utilizadas para fazer biorremediação, biofertilização, bem como para a produção de variados biocombustíveis como o metano, biodiesel, bioetanol e o bio-hidrogênio (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

Segundo Santos (2018), as microalgas têm sido usadas em todo mundo para diferentes propósitos. Além do alto conteúdo de lipídios e carboidratos, elas podem ser consideradas como uma matéria prima excelente por ter rápido crescimento e alta eficiência na fixação de CO<sub>2</sub>. Elas podem ser usadas para produção de biocombustíveis, obtenção de pigmentos, tratamento de efluentes industriais e esgoto.

Muitas vantagens podem ser citadas pela utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis como a não competição com os alimentos e a possibilidade de cultivo em diferentes locais. Como desvantagem, ainda hoje esta produção é vista como pouco competitiva e tecnologicamente cara. Desta forma, muitas pesquisas ainda são necessárias para que se aprimore os processos envolvidos na produção de biocombustíveis de microalgas para que esta nova biotecnologia possa ser consolidada (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

A Figura 4 mostra em quais processos a biomassa das microalgas pode ser submetida para produção de bioenergia e quais produtos podem ser formados.



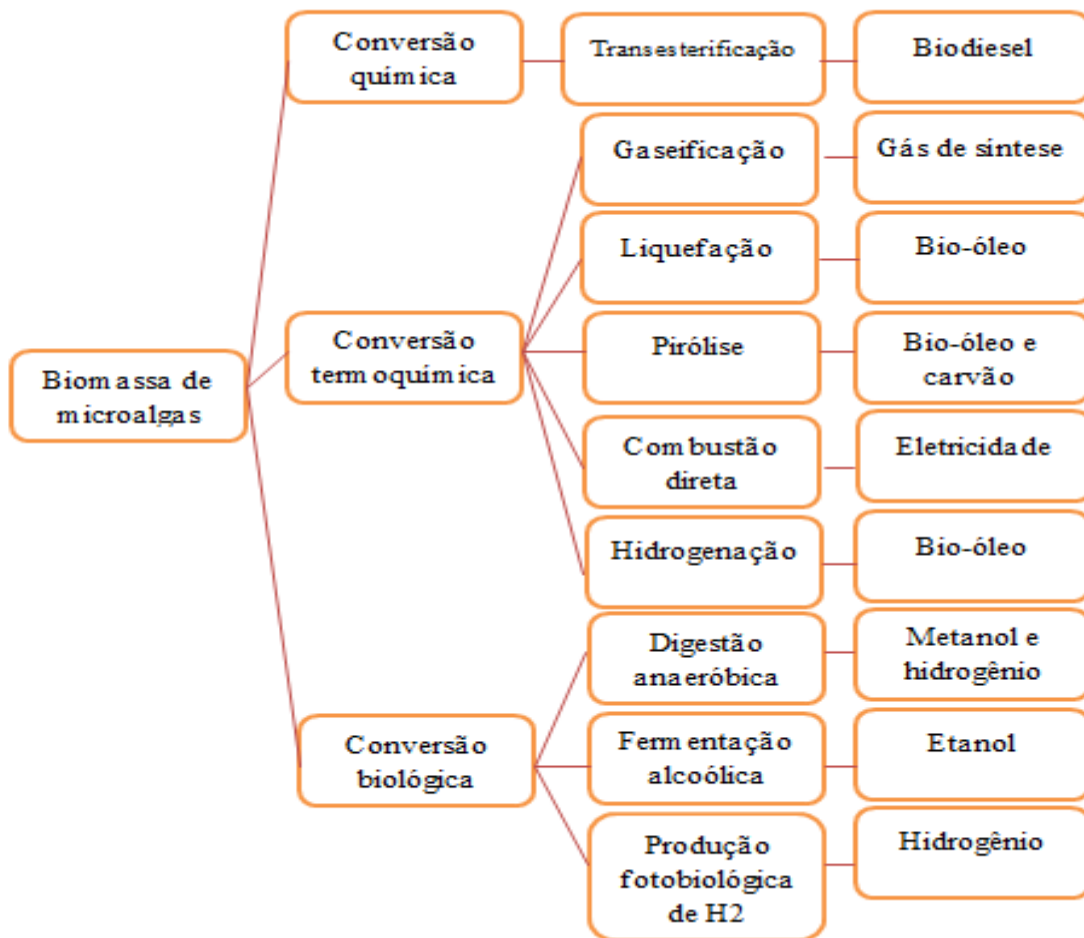


Figura 4: Formação de produtos a partir da biomassa de algas. Fonte: Gris, 2011. Adaptado.

Quanto ao metabolismo, algumas espécies são capazes de alterá-lo de acordo com as mudanças ambientais. O cultivo das algas pode ser: fotoautotrófico, quando tem como única fonte de energia a luz; heterotrófico, quando são usados compostos orgânicos como fonte de carbono e energia e; mixotróficos, quando tanto o metabolismo autotrófico e heterotrófico podem ser utilizados (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI-FILHO, 2014). Segundo (BORGES, 2014), cada espécie precisa de condições específicas para o cultivo. As condições ótimas como temperatura, quantidade de luz, macro e micronutrientes tem que ser otimizadas para que se tenham boas condições para o cultivo. Dentre os gêneros mais utilizados para o cultivo e produção de bio-óleo estão: *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Spirulina* e *Nannochloropsis*.

Além de todas essas aplicações na indústria as microalgas ganharam um grande espaço quando se refere a bioenergia, elas são consideradas como os biocombustíveis de terceira geração, pois tem um grande potencial para a produção de muitos biocombustíveis como biodiesel, bioetanol e bio-hidrogênio (SANTOS, 2016).

A partir deste excedente, o presente trabalho tem como finalidade submeter as

colônias de *Scenedesmus* sp. a um aumento na atividade metabólica de lipídeos, otimizando as condições operacionais de cultivo afim de aumentar o potencial desta microalga na produção de biodiesel.

## 4 – METODOLOGIA

Nesta seção será apresentada a espécie de microalga utilizada para os experimentos, a unidade experimental, o material e os métodos experimentais utilizados.

### 4.1 - Microalgas

Para a produção de lipídeos a partir de microalgas foi utilizada uma espécie de *Scenedesmus*. Todos os testes com as culturas foram realizados no laboratório de Energias renováveis materiais e catálise (LEMARC), da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Pontal em Ituiutaba–MG. As amostras de *Scenedesmus* sp. foram gentilmente cedidas pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara – ILES/ ULBRA, curso de Química – Itumbiara – GO.

As microalgas foram mantidas em um sistema de cultivo dotadas de um fotoperíodo de 12/12: Luz/ Escuro a uma temperatura ambiente próxima a 25°C, Figura 5 (A e B).



Figura 5: Unidade de cultivo. A – Sistema de cultivo desligado. B – Sistema de cultivo ligado. De acordo com o fotoperíodo 12/12 Luz/ Escuro.

#### 4.2 – Planejamento estatístico

Para determinar as condições ótimas de produção de biomassa e crescimento das microalgas, foi empregado um planejamento fatorial fracionário (PFF), que é uma ferramenta estatística que possibilita a determinação das variáveis experimentais que afetam, de forma importante e significativa, o rendimento de lipídeos no crescimento das microalgas. A Tabela 2 apresenta as variáveis e os níveis estudados no PFF  $2^{5-1}$ .

Tabela 2: Variáveis e níveis estudadas no crescimento de microalgas (*Scenedesmus* sp.)

Variáveis		Níveis	
		( + )	( - )
A	Meio de cultivo	Guillard	Chu
B	Quantidades de lâmpadas	3	2
C	Tipos de reatores	Horizontal	Vertical
D	Quantidade de dias de cultivo	30 dias	15 dias
E	Aeração	Não	Sim

Barros-Neto, Scaminio e Bruns (2001) afirmam que a organização do planejamento fatorial deve obedecer as relações geradoras que, por sua vez, deverá apresentar o número de fatores que compõem o termo mais curto presente nessas relações que é, por definição, a resolução do planejamento. Dessa maneira o planejamento fatorial fracionário foi definido como  $2^{5-1}$ . Realizando 16 experimentos, com a relação geradora  $E=AxBxC$  ou  $I= ABCE$ , ou seja, a variável teve sua geração baseada na interação  $AxBxC$ . A matriz de planejamento é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Matriz de planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ 

	A	B	C	D	E
Ensaio					
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+
3	-	+	-	-	+
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	+
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	-	+
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	+
11	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	+
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+

Os ensaios foram realizados aleatoriamente e de maneira organizada, mantendo a conformação do planejamento fracionário  $2^{5-1}$ , apresentado na Tabela 3. O arranjo do primeiro ensaio ficou da seguinte forma:

- Meio de cultivo: Chu (A)
- Quantidades de lâmpadas: 2 (B)
- Tipo de reator: Vertical (C)
- Quantidade de dias de cultivo: 15 (D)
- Aeração: Sim (E)

Os arranjos a seguintes (2, 3, 4, 5... 16), apresentaram a mesma ordem, tendo dessa forma 16 respostas diferentes para rendimento de biomassa, porcentagem de óleo e crescimento celular, assim finalizando a primeira etapa dos ensaios, cuja finalidade foi selecionar as variáveis que mais afetam a porcentagem de lipídeos na produção das microalgas.

#### 4.2.1 – Planejamento composto central (PCC)

A partir das variáveis mais importantes no PFF, os seus níveis foram otimizados empregando um planejamento composto central. As variáveis selecionadas foram os micronutrientes do meio CHU: concentração de zinco (A) e concentração de manganês (B). Estas condições foram definidas, pois a maioria das variáveis estudadas inicialmente eram discretas (sim ou não) e foram fixadas em seu nível de maior rendimento de porcentagem de lipídeo.

Foi realizado um planejamento composto central para duas variáveis, com rotação e triplicate no ponto central, totalizando 11 experimentos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Matriz do planejamento composto central

	<b>Valor</b>	<b>codificado</b>	<b>Valor</b>	<b>percentual</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Ensaio</b>			<b>% Zn</b>	<b>%Mn</b>
1	-	-	50%	50%
2	+	-	150%	50%
3	-	+	50%	150%
4	+	+	150%	150%
5	0	0	100%	100%
6	0	0	100%	100%
7	0	0	100%	100%
8	-1,4	0	30%	100%
9	+1,4	0	170%	100%
10	0	-1,4	100%	30%
11	0	+1,4	100%	170%

Para a realização do PCC, inicialmente realizou-se um estudo sobre quais macro ou micronutrientes poderiam influenciar no rendimento de óleo dentro de um sistema de cultivo. Borges (2014), afirma em seus estudos que a otimização de nutrientes específicos em *Scenedesmus* sp. é favorecida quando existe uma adição de 0,06 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,5 g/L de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , o que representa uma melhora de 161,7% no teor de lipídeos e uma redução de 55,32% na concentração de biomassa.

Lourenço (2006) e Teixeira et al. (2015) afirmam que zinco (Zn) e o manganês (Mn) participam da rota metabólica na produção de lipídeos e que o estudo destes nutrientes em um sistema de cultivo se faz necessária.

A partir do meio de cultivo com a melhor resposta de acordo com o planejamento experimental, ficou definido que o PCC seria realizado para obter uma maior produção de lipídeos a partir de uma otimização para a concentração de zinco (Zn) e manganês (Mn). Para realização dos experimentos foi utilizado como fonte de zinco, o sulfato de zinco hepta-hidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) na concentração de 0,0000882 g/L, o que equivale 100% do valor real. Como fonte de manganês, foi utilizado o cloreto de manganês tetra-hidratado com ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) na concentração de 0,0000144 g/L, que é 100% do valor real. Os valores de concentração de Zn e Mn estudados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de concentrações de sulfato de zinco hepta-hidratado e cloreto de manganês tetra hidratado do planejamento composto central

Níveis codificados	-1,4	-1,0	0	+1,0	+1,4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,00002646	0,0000441	0,0000882	0,0001323	0,0001499
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,00000432	0,0000072	0,0000144	0,0000216	0,00002448

O tratamento dos dados foi realizado pelo software Statística 7,0 ®.

#### 4.3 – Unidade experimental para o cultivo de *Scenedesmus* sp.

As microalgas foram dispostas em cinco prateleiras, distribuídas uniformemente e iluminadas com 3 lâmpadas do tipo “luz do dia”, com fotoperíodo de 12/12 h.

Os reatores horizontais estavam dispostos nas prateleiras A, B, D e E, onde as lâmpadas se situavam na parte superior de cada um dos suportes. Os reatores verticais estavam dispostos na prateleira C e as lâmpadas matinhaem-se na parte posterior dos reatores. Como mostra a Figura 6.

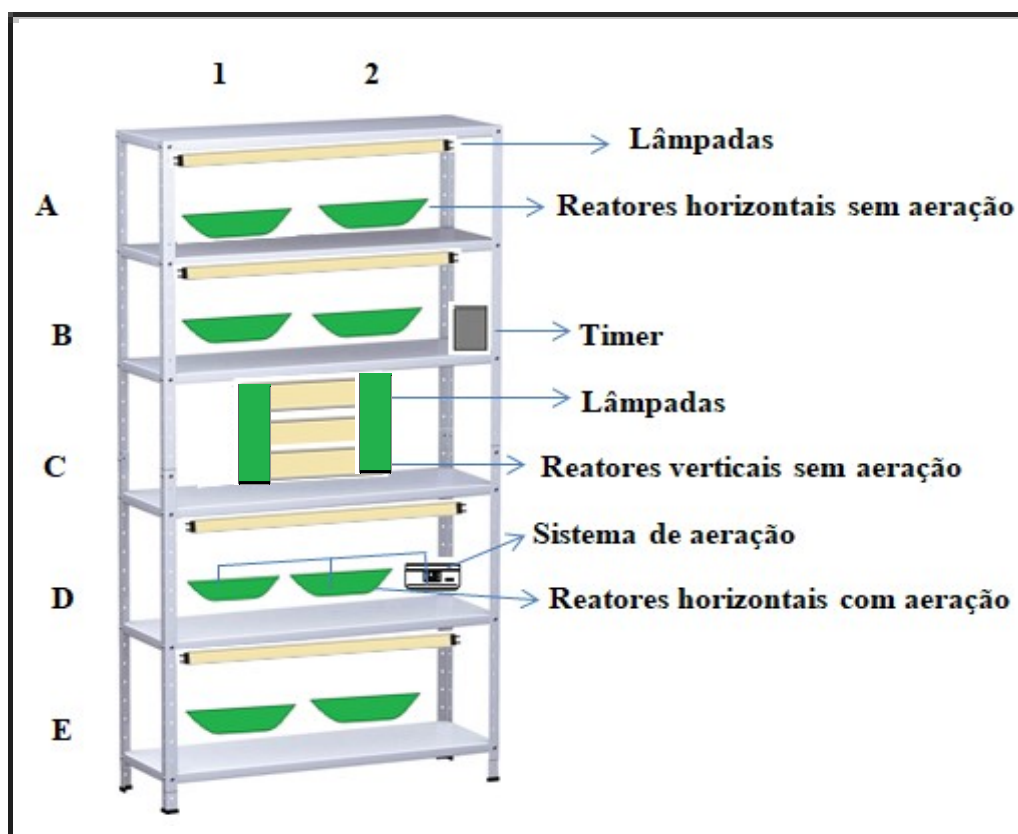


Figura 6: Esquema da unidade experimental de cultivo.

O ajuste de tempo para exposição luminosa foi adequado em um “Timer”, que se situava na prateleira B da unidade de cultivo, o fotoperíodo foi de 12/12h Luz/Escuro de acordo com Cartas (2018). O sistema de aerção tinha como objetivo fazer a homogeneização do meio com as microalgas mediante a uma agitação constante.

Para realizar o crescimento das microalgas em condições ótimas, um planejamento experimental foi realizado, visando, inicialmente, verificar quais as variáveis experimentais mais afetam o crescimento das algas e, em seguida, estabelecer os níveis ótimos dessas variáveis. As condições experimentais estudadas foram definidas de acordo com o disposto na literatura, onde foram realizadas comparações entre as variáveis que são percorridas a seguir:

- Utilizava-se o meio de cultivo Guillard (1975) ou o meio Chu (SANTOS, 2016).
- A unidade experimental era dotada de 3 lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” em todas as prateleiras, utilizava-se de acordo com o modelo experimental 3 ou 2 lâmpadas com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro.
- Os modelos de reatores escolhidos, foram adotados de acordo com Borges (2014), utilizando os reatores horizontais do tipo bandeja (Prateleiras A, B, D e E) e reatores verticais (Prateleira C) de acordo com a Figura 6.



- A quantidade de dias de cultivo foram 15 dias ou 30 dias.
- A aeração foi disposta com reatores com aeração ou reatores sem aeração.

Os reatores horizontais e verticais eram fechados com filme plástico de PVC para diminuir a evaporação da água dos meios de cultivo. Sendo assim, os reatores são do tipo coberto. O volume total dos reatores horizontais era de 1,5L e o dos reatores verticais era de 2,5L porém foram utilizados em ambos o volume útil total de 1L.

#### 4.3.1 – Meio de cultivo Guillard (1975) para *Scenedesmus* sp.

Nos primeiros testes realizados com as microalgas e os primeiros repiques, foi utilizado o meio Guillard (1975), sem a adição de vitaminas e sem a correção de pH, sendo assim o meio Guillard modificado, para diminuição de custo conforme a composição apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Composição do meio Guillard modificado (1975)

Reagentes	Soluções (g/L)	Meio de cultivo
Solução 1: Sais macronutrientes	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O = 36,76 – Cloreto de Cálcio MgSO <sub>4</sub> = 18,04 – Sulfato de Magnésio NaHCO <sub>3</sub> = 12,6 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O = 11,41 NaNO <sub>3</sub> = 85,01 – Nitrato de Sódio Na <sub>2</sub> EDTA = 4,36	4 mL
Solução 2: Sais micronutrientes	FeCl <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O = 3,15 – Cloreto de Ferro III CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O = 0,012 – Sulfato de Cobre ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O = 0,022 – Sulfato de Zinco CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O = 0,012 – Cloreto de Cobalto MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O = 0,18 – Cloreto de Manganês NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O = 0,008 – Molibidato de Sódio	4 mL
Água destilada		1000 mL

Para a preparação do meio Guillard foi necessário primeiramente fazer duas soluções, a primeira com os macronutrientes, e a segunda com os micronutrientes. A solução com sais (macronutrientes) foi preparada utilizando todos os reagentes apresentados na Tabela 6 com volume de 1L em água destilada. A solução de micronutrientes foi preparada da mesma forma com 1L de água destilada.

Após a preparação de ambos meios, eles foram alocados em frascos do tipo ambar previamente lavados e esterilizados.

Para a preparação do meio Guillard para o cultivo de microalgas, foram feitas a

medições com 4 mL de macronutrients (SMA) e 4 mL de micronutrients (SMI) em 1L de água destilada, conforme a Figura 7.

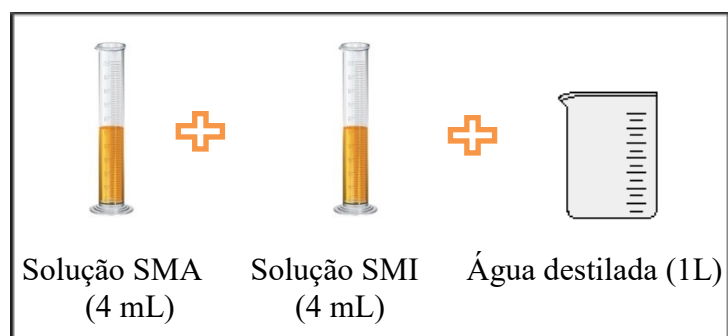


Figura 7: Esquema da unidade experimental de cultivo.

Posteriormente, foi preparado o meio e a medição do inóculo de acordo com as propostas por Borges (2014), tanto para reatores horizontais quanto para reatores verticais, foram utilizados as proporções de:

- 80 % de meio.
- 20 % de inóculo (Microalgas).

As proporções foram estimadas para 1L, como mostra a Figura 8.

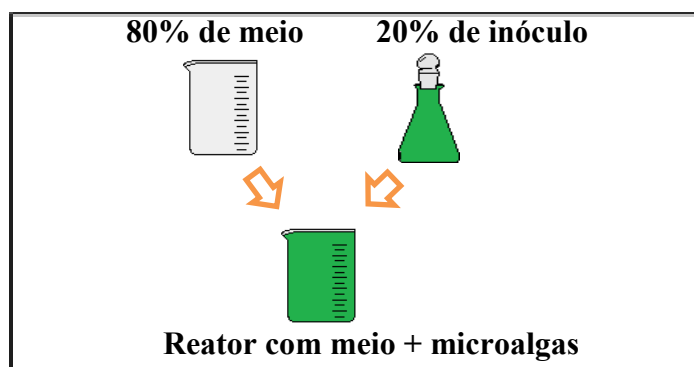


Figura 8: Cultivo de microalgas com meio Guillard.

#### 4.3.2 – Meio de cultivo Chu para *Scenedesmus* sp.

Para os testes realizados com as microalgas *Scenedesmus* sp. e os repiques, foram empregados o meio Chu (SANTOS, 2016) sem a adição de vitaminas e sem a correção de pH, conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Composição do meio Chu (SANTOS, 2016)

Componentes	Concentração final (g/L <sup>-1</sup> )
Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	2,5.10 <sup>-1</sup>
Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	2,5.10 <sup>-2</sup>
Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	7,5.10 <sup>-2</sup>
Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	7,5.10 <sup>-2</sup>
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,75.10 <sup>-1</sup>
Cloreto de sódio (NaCl)	2,5.10 <sup>-2</sup>
Tríplex III/EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O)	5.10 <sup>-2</sup>
Hidróxido de potássio (KOH)	3,1.10 <sup>-2</sup>
Sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO <sub>4</sub> )	5.10 <sup>-3</sup>
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	1,142.10 <sup>-2</sup>
Sulfato de zinco hepta-hidratado (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	8,82.10 <sup>-5</sup>
Cloreto de manganês tetra-hidratado (MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	1,44.10 <sup>-5</sup>
Molibdato de sódio di-hidratado (NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	7,1.10 <sup>-6</sup>
Sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	1,57.10 <sup>-5</sup>
Nitrato de cobalto hexa-hidratado (Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	4,9.10 <sup>-6</sup>

Para realizar o cultivo de microalgas com o meio Chu, foi necessário realizar a pesagem de todos os componentes presentes na Tabela 7 com a adição de 1L de água destilada. Após a preparação do meio de cultivo, a solução foi alocada em um frasco do tipo ambar previamente lavado e esterilizado. Posteriormente, após a preparação da solução do meio Chu, foi feita a medição de 5 mL de meio Chu para cada 1L de água de acordo com a Figura 9.

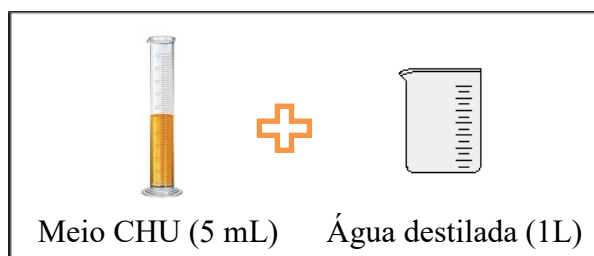


Figura 9: Composição do Chu para o cultivo de microalgas

Para efetuar a preparação meio de cultivo com as microalgas utilizando a solução do meio CHU, foi utilizada a mesma proporção do meio Guillard, mostrada na Figura 8. Foram usadas as quantidades de 80% de meio e 20% de inóculo, ambos para 1L. Essa estratégia de

cultivo foi utilizada por Borges (2014), em reatores para cultivo de microalgas.

#### 4.4 – Avaliação dos cultivos

A resposta avaliada neste estudo foi o rendimento de lipídeos e de biomassa seca de microalgas após cada experimento realizado.

#### 4.5 – Regimes de cultivo

A fim de comparar a produtividade de lipídeos e biomassa entre os diferentes regimes de cultivo, a microalga *Scenedesmus* sp. foi submetida aos regime de batelada, onde todos os experimentos foram realizados em ambiente laboratorial com controle de luminosidade, nutrientes, aeração, diminuído assim os riscos de contaminação.

##### 4.5.1 – Idade do inóculo

Uma das variáveis do trabalho proposto é diversificar a idade do inóculo com a finalidade de trabalhar com as melhores condições de cultivo, para assim otimizar a produção de lipídeos e melhorar o crescimento em cada cultivo. No cultivo de batelada, os microrganismos crescem até chegar a fase estacionária, em que não há em nenhum momento a adição de nutrientes extras ao longo dele. As idades escolhidas para as análises de crescimento e rendimento de lipídeos foram de 15 e 30 dias de acordo com Gris (2011) e Cartas (2018).

##### 4.5.2 – Cultivo laboratorial de microalgas em reatores cobertos

Devido a perda de água durante os cultivos de *Scenedesmus* sp., foi adotada a concepção de cobrir os reatores para evitar a perda de água, transformando estes reatores em reatores cobertos horizontais (do tipo bandeja) ou verticais (KANEMOTO, 2012). Trabalhar com estes tipos de reatores é uma forma de reduzir os custos e otimizar os experimentos.

O volume útil empregado para o cultivo de ambos os reatores foi de 1L, sendo o volume total do reator horizontal de 1,5L e do reator vertical de 2,5L. Todos os testes foram feitos em duplicata para avaliação da dispersão dos resultados.

#### 4.5.3 – Aeração em sistemas de cultivo de microalgas

A aeração do sistema de cultivo das microalgas foi avaliada no rendimento do teor de lipídeos, assim nem todos os reatores dispunham da necessidade da utilização da aeração. Após a realização do preparo dos meios, os mesmos foram colocados nos suportes preestabelecidos do modelo experimental. Nos reatores pré-determinados, os mesmos foram acoplados a aeração em 24 horas, durante todo o período do cultivo.

O modelo adotado é semelhante ao adotado por Vendruscolo (2009), empregando a aeração nos reatores com a finalidade de agitação e homogeneização do cultivo. O aparelho (*Big Air*, modelo *A420 110 V*) tinha uma vazão de 4,5L de ar por minuto, aumentando a oxigenação do sistema, produzindo movimento pelo efeito de bolha de ar, dentro de cada reator, Figura 10.

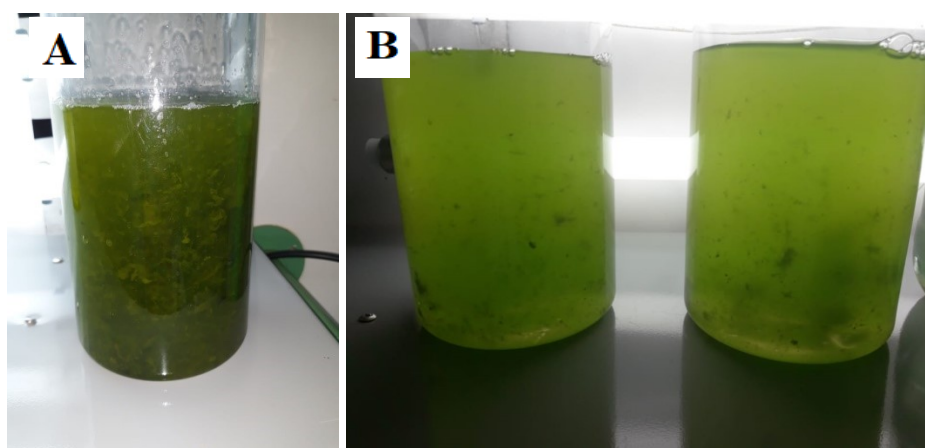


Figura 10: Reatores verticais com regimes diferentes de aeração: reator A sem o sistema de aeração, reatores B com sistemas de aeração

#### 4.5.4 – Variação de nutrientes por diferentes meios de cultivo

Para os experimentos foram utilizados os meios Guillard (1975) e Chu (SANTOS, 2016). Foram realizados testes com cultivos em reatores horizontais e verticais com ambos os meios para encontrar-se o melhor meio de cultivo para rendimento de lipídeos e crescimento de microalgas.

Sabendo que as concentrações são diferentes e havendo uma diversidade significativa de reagentes em cada meio, testes foram realizados avaliando o comportamento das microalgas nos determinados meios.

#### 4.5.5 – Cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. com diferentes intensidades luminosas

A irradiância é um dos fatores de grande importância dentro de um sistema de cultivo de microalgas, pois a iluminação está relacionada diretamente com a fotossíntese destes microrganismos, sendo dessa forma, uma das possíveis variáveis quando se refere ao metabolismo de lipídeos (FRANCO *et al.* 2013).

De acordo com o planejamento de experimentos, os reatores eram dotados de dois sistemas de regimes de cultivo, o primeiro era com três lâmpadas e o segundo com duas lâmpadas para que as microalgas fossem iluminadas com intensidades luminosas, diferentes no decorrer do cultivo. Para que assim se possa verificar se a intensidade luminosa irá interferir no metabolismo e rendimento de lipídeos.

Além da intensidade luminosa outro fator que se faz relevante é quantidade de horas de exposição a luz, desta forma foi adotado o modelo de Kanemoto (2012) e (GRIS, 2011), com 12/12h Luz/Escuro, em que o tempo de exposição era regulado por um timer analógico (*Exatron*, modelo *TMAOB*).

### 4.6 – Métodos analíticos

#### 4.6.1 – Avaliação de crescimento e biomassa através de espectroscopia

A espectroscopia de absorção molecular é utilizada para determinar quantitativamente várias espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas. Ela se baseia na absorção da radiação eletromagnética de espécies absorventes na região de 190 a 800 nm (SANTOS; COSTA, 2016).

Para determinação do crescimento celular admitiu-se o método de espectrofotometria na região do visível, para acompanhamento da produção de biomassa a partir do crescimento em relação ao tempo de cultivo, com as medidas de absorbância no comprimento de onda 570 nm (BORGES, 2014).

A medição de absorbância atualmente é o método mais utilizado para verificar o crescimento de microalgas em meios de cultivo abertos ou fechados. Utilizou-se o espectrofotômetro UV-Vis (espectroscopia ultravioleta visível), da marca *Shimadzu*, e modelo *UV- 1800*.

De acordo com Cartas (2018), para que as análises utilizando o espectrofotômetro sejam satisfatórias, a alíquota deve estar bem uniforme, retirando-a do reator e posteriormente

ela deve ser transferida para a cubeta do espectrofotômetro de 4 mL, onde o equipamento já deve estar ajustado com a amostra “branco”, representado pelo meio de cultivo. Todas as leituras foram feitas em triplicata para uma avaliação de dispersão dos resultados.

A Figura 11 mostra como a leitura do espectrofotômetro acontece, a mesma deve ocorrer quando o meio estiver bem homogêneo para que a leitura seja determinada pela absorção da radiação e não haver o espalhamento, e que a alíquota retirada deve corresponder visualmente todo o volume dentro dos reatores.

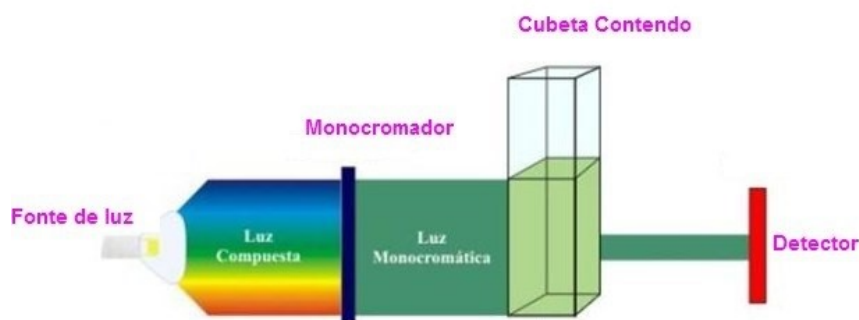


Figura 11: Ilustração esquemática de um espectrocópio de absorção molecular na análise do meio de cultivo da microalga/ adaptado (SANTOS; COSTA, 2016).

#### 4.6.2 – Determinação do peso seco da biomassa

Após a finalização dos dias de cultivo adotados pelo modelo experimental, as amostras dos reatores horizontais e verticais foram centrifugadas em sua totalidade pelo sistema da marca *Aaker*, utilizando um campo centrífugo de 7808g por minuto. Seguindo o modelo experimental de Borges (2014) as amostras foram retiradas e colocadas em um béquer previamente pesado e todo o material foi levado para a secagem em uma estufa por 48h a 80°C. Posteriormente o material foi novamente pesado, para obter a determinação da biomassa final como mostra a Figura 12.



Figura 12: Determinação da biomassa seca

#### 4.6.3 – Quantidade de óleo e teor de lipídeos

Folch, Lees, Stoane-Stanley (1956), apresentam um método bastante eficaz em relação a determinação da quantidade de óleo e teor de lipídeos que foi descrito posteriormente por González, Kafarov e Monsalve (2009). Inicialmente, a biomassa depois de seca é macerada com 20 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol, como mostra a Figura 13-A, a mistura obtida resultante da biomassa macerada com metanol e clorofórmio, foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL e levado ao banho ultrassônico (*Quimis*) a 40 kHz por 90 minutos, Figura 13-B. Posteriormente, a amostra foi colocada em tubos de centrifugação do tipo falcon e submetida a centrifugação a 4800 rpm por 8 minutos.

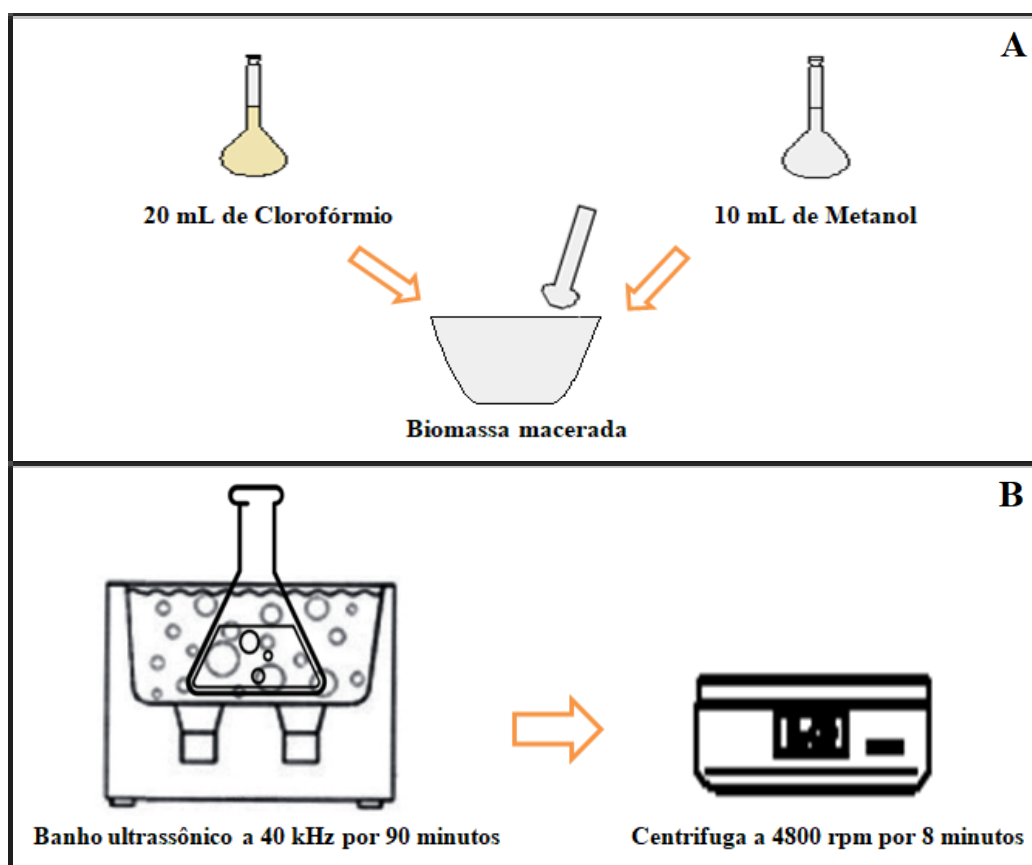


Figura 13: Procedimento inicial para determinação da quantidade de óleo e lipídeos: maceração da biomassa com reagentes específicos (A), processo de banho e centrifugação do material obtido (B)

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e alocado em funil de separação, foram adicionadas à mistura 6 mL da solução de KCl 0,88%, Figura 14-A. A solução passou por uma agitação e houve a formação de duas fases, a fase inferior contendo os lipídeos e a fase superior hidrofóbica. Posteriormente, foram adicionado aos lipídeos 2 mL de metanol e 2 mL de água destilada e novamente a solução passou por agitação, Figura 14-B.



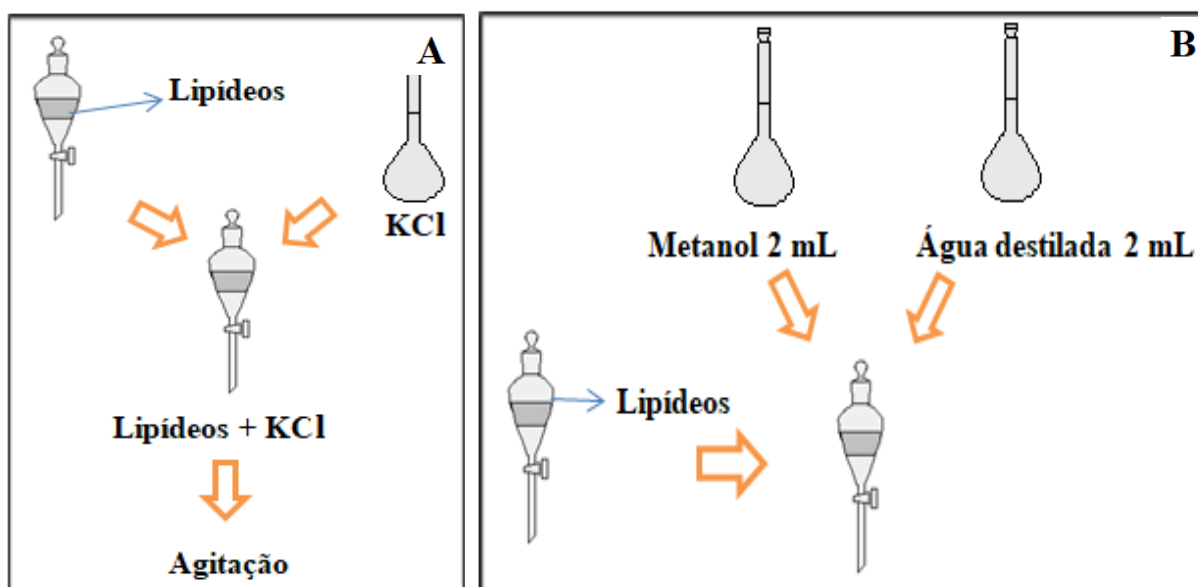


Figura 14: Procedimento para determinação da quantidade de óleo e lipídeos: adição de KCl (A), acréscimo de metanol e água destilada (B).

Novamente, o sobrenadante foi retirado e na fase excedente filtrada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Sulfato de sódio anidro), e disposto em um béquer previamente pesado (Figura 15–A). Posteriormente, o béquer foi colocado em uma capela de exaustão (Figura 15–B), o solvente residual que restava no béquer passou pelo processo de evaporação por 48h e os lipídeos restantes no béquer foram pesados e dessa forma, foi contabilizada como teor de óleo final.

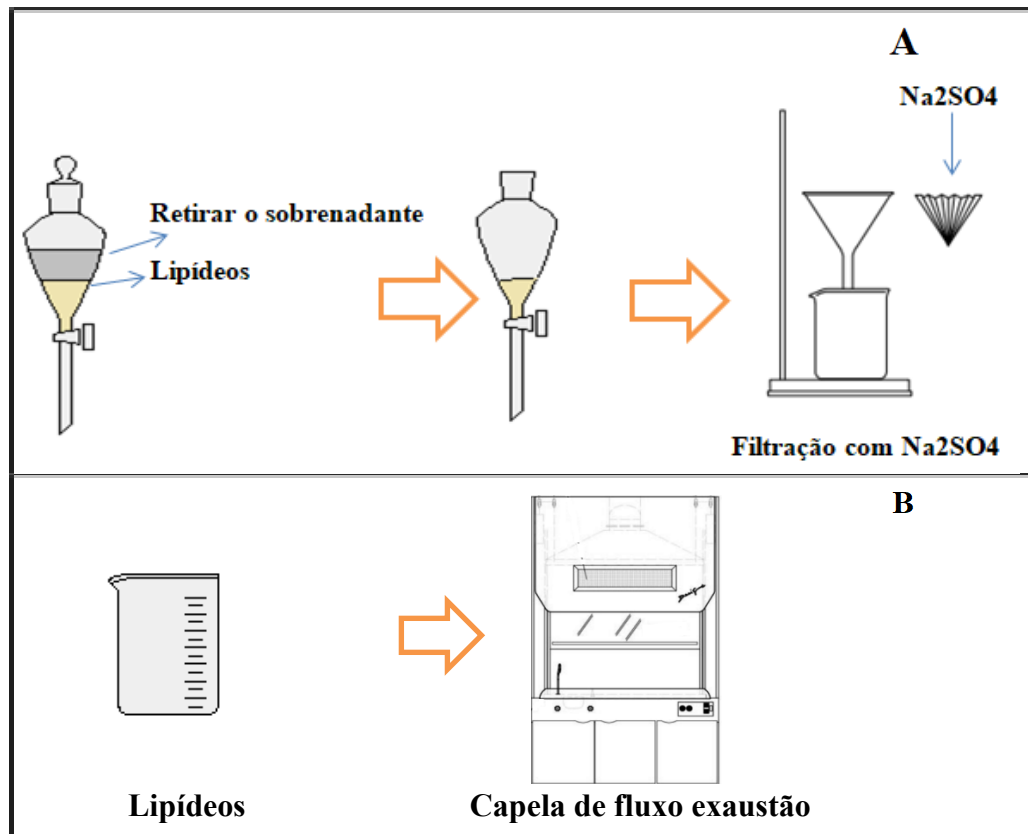


Figura 15: Procedimento final de extração de óleo: filtração com sulfato de sódio anidro (A) e evaporação dos solventes em uma capela de exaustão (B)

Para determinar o teor de óleo final em porcentagem mássica foi adotada a Equação 1:

(1)

$$TL = \frac{MO \cdot 100}{MB}$$

Onde:

- TL: teor de lipídeos, expressa em porcentagem (%).
- MO: massa de óleo produzida, expressa em gramas (g).
- MB: massa da biomassa, presente em 1L de meio de cultivo (g).

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção foi segmentada da seguinte forma: as subseções 4.1 e 4.2 correspondem os experimentos realizados de acordo modelo experimental adotado. A subseção 4.1 é a primeira etapa do modelo experimental, 4.2 corresponde a segunda etapa do planejamento experimental.

A subseção 4.1 ainda vai ser subdividida em: geração de biomassa a partir do crescimento celular e comportamento da microalga *Scenedesmus* sp. em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo em diferentes regimes de cultivo em microalgas.

### 5.1 – Modelo experimental 1

#### 5.1.1 - Geração de biomassa a partir do crescimento celular

Para realizar-se a determinação do crescimento celular foi utilizado o método de espectrofotometria de absorção na região do visível, para acompanhar a produção de biomassa, usou-se o comprimento de onda de 570 nm largamente utilizado para os estudo de crescimento celular envolvendo microrganismos, principalmente as microalgas.

As leituras de absorbância foram realizadas com a precaução de que as amostras demonstrassem o aspecto real de cada um dos reatores. O monitoramento de crescimento das microalgas foi realizado em dias aleatórios com leituras nos dias 0, 4, 8, 12, 16..., visando o acompanhamento do crescimento celular em dias alternativos.

A Figura 16, apresenta o crescimento gradual das microalgas ao longo de 30 dias de cultivo até a fase estacionária.

De acordo com Santos (2016), existem as etapas de crescimento e essas são bem definidas, a primeira fase é chamada de fase “lag”, ou fase adaptativa, que ocorre nos primeiros dias de cultivo. Essa fase tem como principal característica o período de adaptação fisiológica das células devido a um novo regime de cultivo. A segunda fase é chamada de fase exponencial, ou logarítmica, que ocorre gradualmente ao cultivo, isso indica um crescimento significativo de células, onde a todo momento as células vão consumindo os nutrientes que estão em seu meio de cultivo. A terceira e última fase é a chamada de fase estacionária que geralmente ocorre após ao 22º dia de cultivo e 30º dia de cultivo, onde as microalgas já consumiram praticamente todos os nutrientes que pertenciam ao meio.

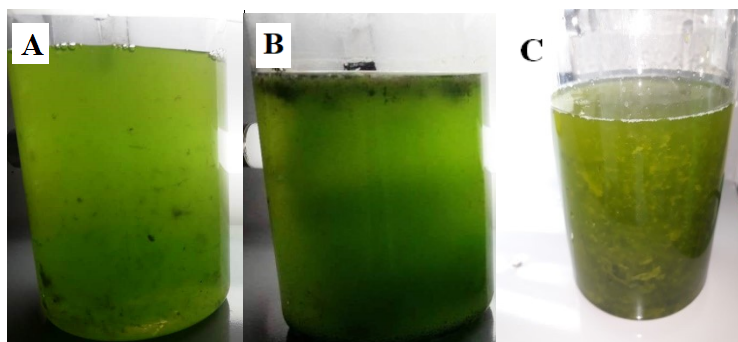


Figura 16: Crescimento das microalgas em diferentes dias de cultivo. (A) Microalgas com 7 dias após início do experimento, (B) Microalgas com 15 dias de crescimento, e (C) Microalgas com 30 dias de cultivo

A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em diferentes regimes de cultivo, e a partir da leitura de absorbância foi possível observar o crescimento celular em função do tempo de cultivo, conforme mostra a Figura 17.

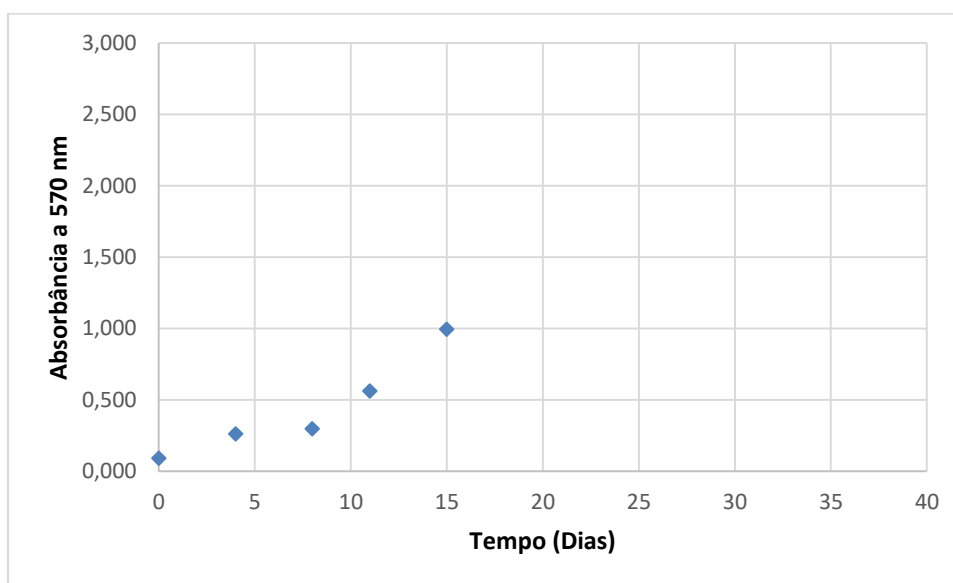


Figura 17: Curva de inóculo para crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. 15 dias de cultivo – Reator 1

A Figura 17 mostra que nos primeiros dias realiza-se a adaptação das microalgas com o meio de cultivo, uma adaptação as novas condições e a uma maior quantidade de nutrientes em contato com as microalgas.

Na Figura 18, pode se notar que a fase exponencial se vê de forma bem perceptível no decorrer do cultivo tendo uma larga expansão entre o 11º e 15º dias, o que demonstra um crescimento semelhante ao observado por Cartas (2018), que realizou cultivos com diferentes parâmetros de cultivo para distintas microalgas. O cultivo de *Scenedesmus* sp. que a autora realizou foi de 30 dias e quando comparado a este reator do presente estudo as leituras de

absorbância são bem semelhantes.

A fase exponencial pode ser observado, claramente, na Figura 18, no ensaio 16 com regime de 30 dias do ensaio 16, onde percebe-se a fase a exponencial de forma clara, tendo um grande aumento após o 15º dia até o 25º.

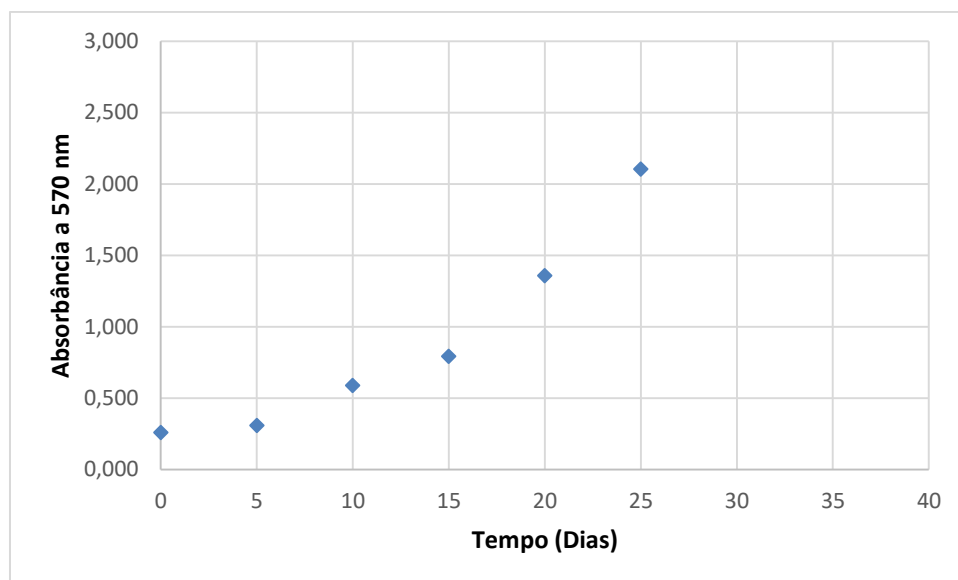


Figura 18: Curva de inóculo para crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. 30 dias de cultivo – Reator 16

Diante desse quadro de resultados, o crescimento em um regime de 15 dias e 30 dias apresenta algumas conformidades, onde no ensaio 1, a leitura de absorbância no 4º dia apresenta o valor de 0,261 e no ensaio 16 no 5º dia apresenta 0,309. Porém, em outros ensaios a fase exponencial ocorre em diferentes momentos, o que mostra uma adaptação muito maior das microalgas em um regime alternativo anterior, como aeração ou meio de cultivo, conforme mostra a Figura 19.

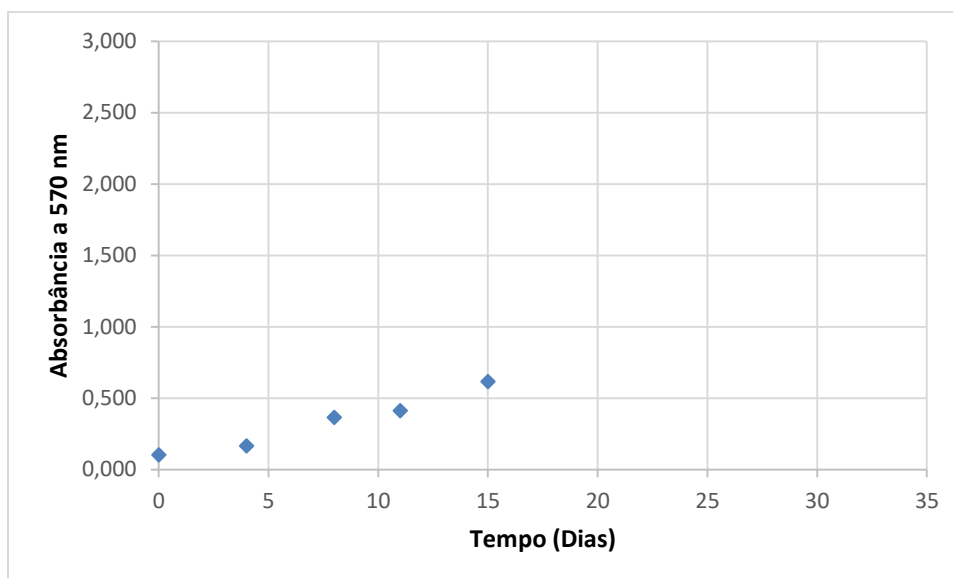


Figura 19: Curva de inóculo para crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. 15 dias de cultivo – Reator 4

Na Figura 18 pode-se notar uma grande diferença na leitura de absorbância quando comparado com as leituras do reator 1 e 16. O que percebe-se neste gráfico, é que a presença de aeração pode apresentar um ganho na fase exponencial, pois o objetivo da aeração é a agitação constante com a finalidade de homogeneizar o meio, sendo assim os nutrientes estão a todo momento em contato com as microalgas, favorendo uma maior eficiência no cultivo.

Esse fato reforça a ideia que a aeração contribui positivamente para o cultivo de microalgas, sendo utilizada por Gris (2011), Cartas (2018) e Vendrúsculo (2009). Pode-se notar na Figura 18 que no 4º ao 8º dia e 11º ao 15º, houve dois grandes aumentos nos valores de absorbância diferentemente dos valores apresentados nas Figuras 17 e 18, onde houveram crescimentos pontuais e apenas uma grande alteração de valor.

É muito importante para as leituras de absorbância que os meios estejam bem homogêneos, para que a retirada da alíquota apresente um valor real atribuído ao restante do meio. Porém, em cultivo sem a aeração pode-se perceber que as microalgas tiveram uma grande decantação nos reatores verticais e horizontais o que em alguns momentos dificultou a retirada da amostra para realização dos experimentos, como mostra a Figura 20.

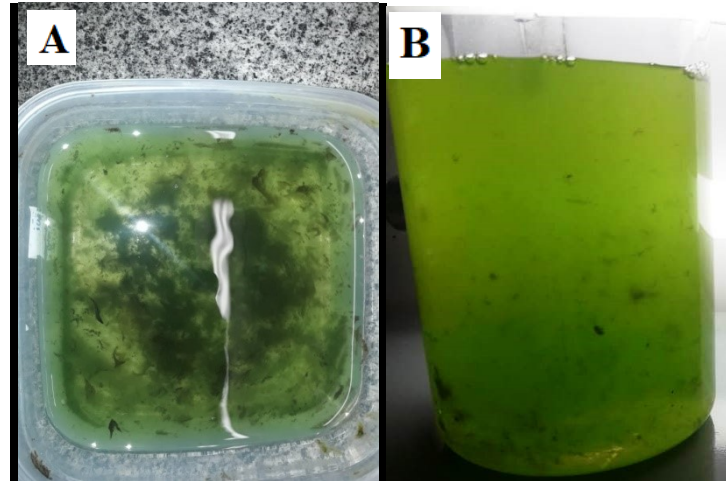


Figura 20: Reator horizontal sem aeração (A) e reator vertical dotado de aeração (B).

Neste sentido, pode-se perceber que reatores com aeração além da homogeneização dos meios, ela atua com a “quebra”, ou separação dessas células evitando assim seu agrupamento. As leituras no espectrofotômetro acabam tendo múltiplos valores e dessa forma a triplicata foi aplicada. Foram realizadas mais análises a fim de ter um resultado mais próximo do real, apresentado na Figura 21.

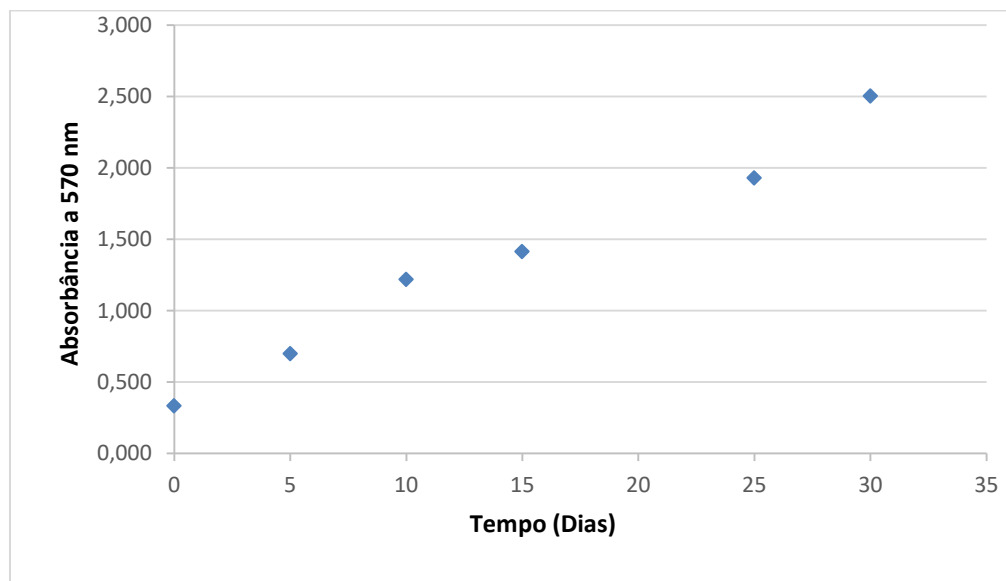


Figura 21: Curva de inóculo para crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. 30 dias de cultivo – Reator 10

Após a análise em quintuplicata que foi necessária em alguns reatores em regime de aeração os valores apresentados exibem respostas bem diferentes dos resultados apresentados até o momento, todavia este reator não apresentou um rendimento de biomassa seca tão grande 0,6387, ou seja, um valor alto de absorbância como foi apresentado na Figura 21, no 30° dia com 2,502 não representa uma quantidade significativa de biomassa.

Deve-se ainda salientar que a análise espectrofotométrica deve estar isenta de partículas senão haverá espalhamento de luz e não absorção, o que demonstra novamente que a aeração é de fundamental importância para a homogeneização do meio e quebra dos agrupamentos celulares para a leitura espectrofotométrica. Isso pode ser devido ao desvio de luz por partículas do meio de cultivo, afetando a medida experimental.

#### 5.1.2 – Comportamento da microalga *Scenedesmus* sp. em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo

Os resultados obtidos para os 16 experimentos do planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ , com relação ao teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca dos reatores verticais e horizontais estão apresentados na Tabela 8.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 8, verifica-se que os maiores valores dispostos em porcentagem para rendimento de óleo são com os reatores dotados de aeração, nos ensaios 1, 4, 6, 7, 9, 12, 14 e 15, com os valores de 17,99%, 14,17%, 12,56%, 7,87%, 18,19%, 15,53%, 13,34%, 19,84% respectivamente. Porém deve-se salientar que alguns reatores específicos como os reatores 5 (11,31%) e 11 (12,71%) apresentaram bons resultados em rendimento de óleo mesmo sem a presença de aeração.



Tabela 8: Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para *Scenedesmus* sp.

Ensaio	Biomassa seca (g/L)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)	Teor de lipídeos extraído das células (%)
1	0,5529	0,0994	17,99
2	0,7084	0,0630	8,90
3	1,4250	0,1054	7,39
4	0,1834	0,0026	14,17
5	1,0280	0,1162	11,31
6	0,1489	0,0187	12,56
7	1,8130	0,1426	7,87
8	1,2532	0,0892	7,12
9	1,6441	0,2990	18,19
10	0,6387	0,0378	5,92
11	1,2533	0,1593	12,71
12	1,0951	0,1700	15,53
13	0,9728	0,0603	6,20
14	0,7602	0,1014	13,34
15	0,6154	0,1220	19,84
16	1,2931	0,1073	8,30

De acordo com Borges valores acima de 10% de teor de lipídeos extraído das células são valores aceitáveis quando existe uma otimização de processos de cultivo de microalgas. Dessa forma, para um melhor aprimoramento da otimização do processos de cultivo, os resultados e estudos das variáveis foram otimizados para melhores resultados posteriormente. As variáveis estudadas foram: meio de cultivo, luminosidade, tipos de reatores, tempo de cultivo e presença de aeração.

Posteriormente, foi realizado os calculos dos efeitos das variáveis estudadas e suas interações sobre o teor de lipídeo, conforme a Matriz Z do planejamento apresentada na Tabela 9. As respostas neste experimento foram para porcentagem de lipídeos extraído das células. A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento de experimentos realizada para a otimização dos processos de produção de lipídeos por reator extraído das células, de acordo com o PFF  $2^{5-1}$ .

Tabela 9: Porcentagem de lipídeos de acordo com o planejamento fatorial  $2^{5-1}$  – Matriz de planejamento. Meio de cultivo (M), luminosidade (L), tipos de reatores (R), tempo de cultivo (T) e presença de aeração (A).

[illegible]

A partir dos resultados de porcentagem de lipídeos, os efeitos foram calculados segundo a diferença entre as médias aritméticas (MA) de porcentagem de lipídeos em cada nível estudado (-) e (+) de acordo com a Equação 2.

(2)

$$Ef = R(+) - R(-)$$

Onde:

- Ef:: efeito da variável.
- R (+): é a porcentagem média da MA de lipídeos no nível alto da variável (+).
- R (-): é a porcentagem da MA de lipídeos no nível baixo da variável (-).

Para a construção do gráfico z foram calculadas as interações entre os efeitos resultando em um total de 16 efeitos: os cinco principais, as interações de dois fatores, interação de três fatores e uma interação entre os cinco fatores. Barros-Neto *et al.* (2001) afirmam que para se realizar os cálculos de efeitos de interação entre as variáveis, multiplica-se os sinais dos níveis de cada elemento, realizando as interações pela multiplicação de duas em duas e depois das outras que faltam. Os efeitos das interações principal, entre dois fatores, entre três fatores e entre todos os fatores que estão apresentados na Imagem 22.

De acordo com os valores de efeito, a presença de aeração, dentro do estudo apresentou uma maior influência na produção de lipídeos para o cultivo de microalgas. Em sequência o efeito de interação luminosidade e tempo de cultivo (Efeito 24), e o efeito de interação de meio e luminosidade. Os demais efeitos apresentam menor influência em relação a produção de lipídeos. Os valores de efeitos podem ser melhores visualizados na imagem a seguir.

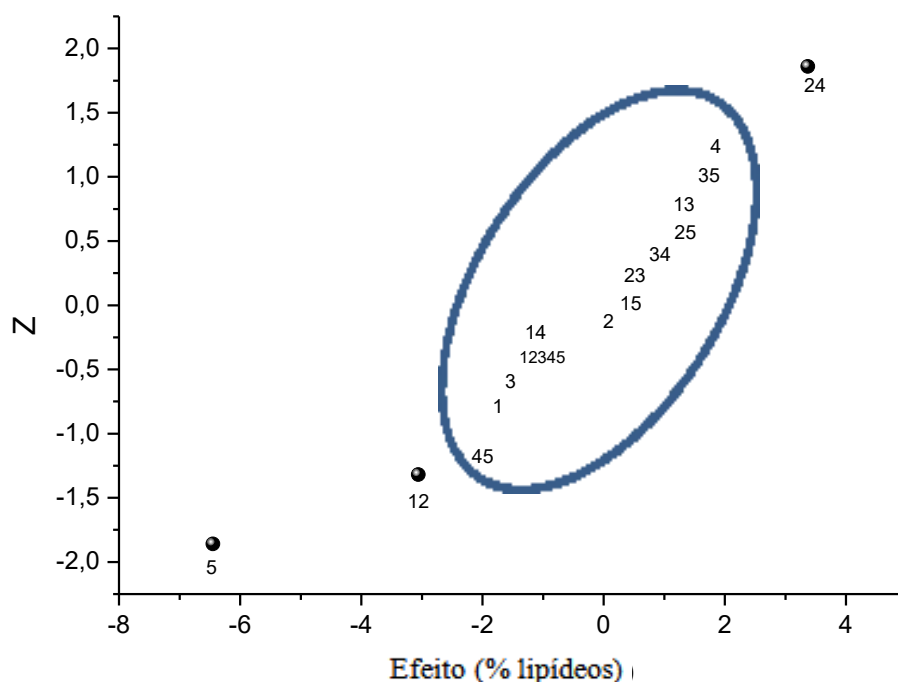


Figura 22: Gráfico normal de efeitos para a produção de lipídeos em cultivo de microalgas. 1= meio de cultivo, 2= luminosidade, 3= tipo de reator, 4= tempo de cultivo, 5= presença de aeração.

Vieira (2018), afirma que 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 círculo estão os valores de efeito menos significativos, incluindo as variáveis meio, tempo e luminosidade.

A partir das respostas obtidas no planejamento experimental  $2^{5-1}$  com os melhores resultados fica claro que a variável 1 (Meio de cultivo), obteve o valor de -1,95, ou seja, o meio de cultivo Chu influencia positivamente o rendimento de lipídeos para o cultivo de microalgas. A variável 2 (Luminosidade) apresentou o valor de -0,19, o que demonstra que a incidência luminosa com maior (3 lâmpadas) ou menor (2 lâmpadas) valor não foi significativa para os resultados. A variável 3 (Reator) teve como resposta o valor de -1,78, o que demonstra que o reator vertical causou uma influência maior no rendimento de lipídeos que o reator horizontal. O fator tempo ficou com o valor de 1,59 onde a maior quantidade de dias de cultivo foi melhor para a resposta final.

Dentre todas as variáveis discretas que este trabalho avaliou, a que mais se destacou foi a variável 5 (Aeração) que se encontra com valor negativo no gráfico normal de efeitos o

que significa que a presença de aeração se faz necessária e que ela é altamente eficaz na resposta do experimento em porcentagem de lipídica. A luminosidade e o tempo de cultivo (24) apresentam os efeitos de interação com valor positivo, ou seja, o cultivo de 30 dias com uma maior incidência de luz pode favorecer o metabolismo de lipídeos. O efeito de interação entre o meio e a luminosidade (12) estão representados com valores negativos o que demonstram que ou maior luminosidade em menor tempo de cultivo (duas lâmpadas tipo luz do dia e 30 dias de cultivo) o resultado também é promissor.

Desta forma, para a composição da próxima etapa experimental ficou definido que o cultivo deveria se manter com as variáveis através das respostas mais significativas, que foram meio de cultivo Chu, quantidade de lâmpadas com influência luminosa maior (3 lâmpadas), reator vertical, quantidade de dias de cultivo maior (30 dias) e com a presença de aeração.

## 5.2 – Modelo experimental 2 – Planejamento composto central $2^2$ (PCC)

Para a composição do PCC, as variáveis discretas que foram definidas no PFF foram fixadas nos melhores resultados expostos a partir disso, pesquisas bibliográficas foram realizadas a fim de verificar quais macronutrientes ou micronutrientes poderiam influenciar positivamente em uma maior quantidade de lipídeos, em um regime de cultivo de microalgas através do meio Chu (definido no PFF).

Para a realização da otimização do teor lipídico em cultivo de *Scenedesmus* sp. o Zinco (Zn) e o Manganês (Mn) merecem destaque a partir dos estudos de Borges (2014), Lourenço (2006) e Teixeira *et al.* (2015), em que a otimização da quantidade de Zn e Mn em cultivo de microalgas se faz necessária, pois ambos participam da rota metabólica na produção de lipídeos.

Nesta etapa foram realizados 11 experimentos que apresentaram diferentes respostas a partir dos níveis avaliados de Zn e Mn. A Tabela 10, apresenta o resultados de biomassa seca, quantidade de óleo produzida e teor de lipídeos extraídos das microalgas, seguindo os experimentos realizados no PCC.

Tabela 10: Resultados para a biomassa seca, quantidade de óleo produzida e teor de lipídeos extraído das células para *Scenedesmus* sp.

Ensaio	Biomassa seca (g/L)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)	Teor de lipídeos extraído das células (%)
1	0,6657	0,0282	4,23
2	0,4873	0,0388	7,96
3	0,7531	0,0801	10,63
4	1,7381	0,0997	5,73
5	0,9889	0,0794	8,02
6	1,0459	0,1055	10,08
7	0,5601	0,0916	16,35
8	1,1093	0,0687	6,19
9	0,9552	0,0627	6,57
10	0,9514	0,1051	11,04
11	1,2147	0,1614	13,29

A Tabela 10 apresenta os 11 experimentos realizados de acordo com o PCC. Pode-se observar que algumas respostas foram superiores a 10%, quando se expressa a relação em teor lipídico dentro da literatura. Borges (2014) cita em seus estudos que é possível atingir esses resultados de acordo com a otimização de regimes de cultivos. Valores superiores a 10%, podem ser alcançados utilizando condições ótimas de cultivo.

Os ensaios 3, 6, 7, 10 e 11, apresentaram os valores de 10,63%; 10,08%; 16,35%; 11,04% e 13,29% respectivamente estes resultados são semelhantes a Trevisan, Branco e Arroyo (2019) que obtiveram o resultado de 12,7% de lipídeos em seus estudos com cultivos de microalgas. Guarieiro (2019), apresentou respostas similares aos experimentos feitos com o resultado de 11,21% para cultivo de microalgas utilizando vinhaça para a obtenção de biodiesel.

Posteriormente, as respostas obtidas foram tratadas no software estatística. A partir dos resultados foi gerado o modelo matemático:

$$\% = 11,5 - 0,08 \cdot x + 0,93 \cdot y - 3,11 \cdot x^2 - 2,16 \cdot x \cdot y - 0,20 \cdot y^2$$

Derivando o modelo matemático em função de x e y e igualando a zero, encontramos a região de máximo da superfície de respostas, ou seja, as condições de nutrientes que

proporcionam maiores porcentagens de lipídeos no experimento.

Esses valores indicam que as condições ótimas de concentração de nutrientes do meio de cultura são de 130% de Zinco, resultando em 10,19% de teor de lipídeos. Em valores reais a concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  é de 0,00011466g. Os valores codificados e decodificados para Mn ainda devem ser melhor estudados pois o menos realizando uma interação no meio com Zn não apresentou grande rendimento lipídico. Os efeitos das variáveis para concentração de Zn e Mn também podem ser visualizados na Figura 23, para a resposta teor de lipídeos em um gráfico de superfície de resposta.

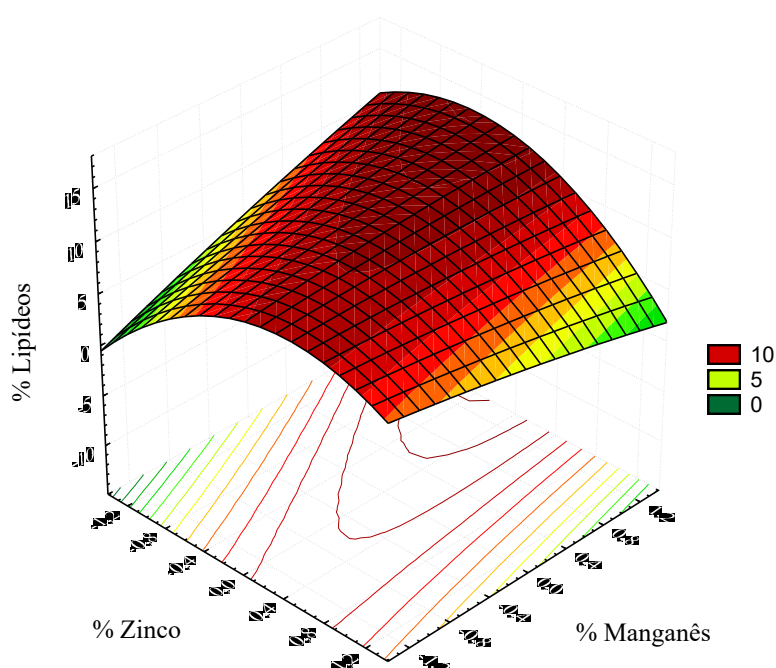


Figura 23: Superfície de resposta para teor de lipídeos em relação a concentração de Zinco e Manganês

De acordo com a superfície de resposta, o melhor valor de rendimento de lipídeo pelas microalgas *Scenedesmus* sp. seria obtido quando a porcentagem de zinco é de 130% GL. Nestas condições o rendimento lipídico no experimento é de 10,19%.

Cada valor numérico apresentado no gráfico nos eixos X, Y e Z tem um significado específico sobre a importância de cada uma das variáveis apresentadas neste estudo. A % apresentada em zinco e manganês vão promover a resposta de % de lipídeos.

Para se obter uma quantidade específica de lipídeos, é necessário considerar todos os componentes de um sistema de cultivo como: aeração, meio de cultivo, adição ou retirada de nutrientes, luminosidade, tipo de reator, tempo de cultivo, temperatura e adição de vitaminas. Vale salientar que trabalhar com condições ótimas com os parâmetros citados podem proporcionar maior rendimento lipídico em um sistema de cultivo de microalgas. Ainda neste estudo vale destacar que não houve um estudo envolvendo adição de vitaminas no meio de cultivo e controle de temperatura.

Borges (2014) e Vendrúsculo (2009), apresentam em seus estudos que o controle de temperatura pode favorecer o rendimento lipídico, pois as microalgas tem um maior crescimento e regulação de atividade metabólica em temperaturas mais baixas. Borges (2014) ainda apresenta em seu trabalho um estudo detalhado sobre a adição de vitaminas e seu rendimento lipídico em cultivo de diversas microalgas.

Ao longo do cultivo e das leituras de absorbância pôde-se observar que o tempo de cultivo ainda pode ser otimizado visto que a fase exponencial pode ser se encontra até o 22º dia de cultivo, o que demonstra que após esse período as microalgas podem começar a consumir os lipídeos em suas células que foram sintetizados em todo o cultivo.

Trevisan (2019) afirma em seus estudo que taxas elevadas de acúmulo de lipídeos podem ocorrer quando há deficiência nutricional ou até mesmo quando as células passam a reduzir o taxa de multiplicação celular para dar lugar ao acúmulo energético, ou seja, acúmulo lipídico.



## 6 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados do planejamento fracionário  $2^{5-1}$  e do planejamento composto central é possível concluir que:

- A otimização dos reatores se faz necessária pois alguns resultados ainda podem ser melhorados visto que a espécie de microalga *Scenedesmus* sp., pode ter um rendimento de óleo superior a 30%, onde a literatura apresenta bons resultado de rendimento de óleo a partir de 10% podendo superar os 30%.
- Ficou claro, a partir dos resultados obtidos, que os reatores dotados de aeração obtiveram valores superior a quase todos os reatores sem aeração com valores de 7,12% até valores com 19,84%.
- O efeito reator não apresentou grande influência em relação a resposta dos experimentos o que demonstra que a utilização dos reator horizontal ou vertical para o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. é facultativo para massa de lipídeos, porém o reator vertical apresenta maior valor de efeito -1,78.
- Pode-se notar que os efeitos aeração (-), luminosidade e tempo (+), meio e luminosidade (-), apresentaram uma maior influência na produção de lipídeos em relação aos outros 13 efeitos. E que continuar o cultivo utilizando a otimização dos resultados positivos até o momento pode acarretar em uma maior influência na resposta para produção de lipídeos.
- A otimização de fontes de Zn e Mn faz-se necessária visto que as melhores respostas para Zn foi 130%.
- É necessária realizar a reprodutibilidade dos resultados do PFF e PCC em grande escala afim de verificar os resultados e o mais estudo para o entendimento da relação Zn e Mn.<sup>49</sup>
- Mais testes ainda precisam ser feitos para que se possa determinar os melhores parâmetros de cultivo para a microalga *Scenedesmus* sp., pois sabe-se que a incorporação de algumas variáveis podem aumentam gradativamente o valor de porcentagem de lipídeos, são elas a temperatura e a adição de vitaminas nos regimes de cultivo.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, H. DE. Alga pode substituir o petróleo na produção de combustível. Disponível em: <<https://super.abril.com.br/ciencia/alga-pode-substituir-o-petroleo-na-producao-de-combustivel/>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI-FILHO, A. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 115, 2014. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2014v35n2p125>

ANP. Abastecimento em números: Boletim Gerencial - Superintendência de Distribuição e Logística. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/distribuicao-e-revenda/leiloes-de-biodiesel>>. Acesso em: 02 set. 2018.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. UNICAMP ed. Campinas – SP. 2001.

BATISTA, A. C. F.; RODRIGUES, H. S.; PEREIRA, N. R.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G.; VIEIRA, A. T.; OLIVEIRA, M. F. Use of baru oil (*Dipteryx alata* Vog.) to produce biodiesel and study of the physical and chemical characteristics of biodiesel/petroleum diesel fuel blends. **Chemistry and Technology of Fuels and Oils**, v. 48, n. 1, p. 13-16, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10553-012-0329-0>

BATISTA, A. C. F.; SILVA, T. A.; VIEIRA, A. T.; OLIVEIRA, M. F. Biotechnological Applications of Lipases in Biodiesel Production. **Taylor Francis Group, LLC**, 2014. <https://doi.org/10.1201/b15247-13>

BORGES, W. DA S. **Produção De Bio-Óleo Empregando Microalgas Em Diferentes Meios De Cultivo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química: Programa de Pós Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

CARDOSO, A. DA S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542, 2011.

CARTAS, L. C. **Isolamento e cultivo de microalgas em resíduo liquid do processamento da mandioca: manipueira**. Dissertação (Mestrado em Bioctenologia: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2018.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>

DOSHI, A.; PASCOE, S.; COGLAN, L.; RAINEY, T. J. Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 329-337, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.027>

ELRAYIES, G. M. Microalgae: Prospects for greener future buildings. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, n. May 2017, p. 1175-1191, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.032>

FERNANDES, R. K. M. PINTO, J. M. B.; MEDEIROS, M.; PEREIRA, C. A. **Biodiesel a Partir De Óleo Residual De Fritura** : Alternativa Energética E Desenvolvimento Sócio-Ambiental. XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Rio de Janeiro, 2008.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. DA S.; SCABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etilícos, Caracterização Físico-Química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100004>

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 999-1033, 1956.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L.; ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: Avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>

GAMA, P. E.; GIL, R. A. DA S. S.; LACHTER, E. R. Produção de Biodiesel Através de Transesterificação In Situ de Sementes de Girassol Via Catálise Homogênea e Heterogênea. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1859-1862, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900007>

GOLDENSTEIN, M.; AZEVEDO, R. L. S. Combustíveis alternativos e inovações no setor automotivo: Será o fim da era do petróleo? BNDES Setorial. Disponível em: <<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2531>>.

GONZÁLEZ, A. D.; KAFAROV, V.; MONSALVE, A. G. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. **Prospectiva**, v. 7, n. 2, p. 53-60, 2009.

GRIS, L. R. S. **Produção da Microalga Nannochloropsis oculata em Fotobiorreator Airlift**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química: Departamento de Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GUARIEIRO, M. DOS S. **Utilização da vinhaça no cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* (Kützinger) Silva visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de**

**biodiesel**. Mestrado (Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 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](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3).

HU, Q. SOMMERFELD, E. J.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.

ISLAM, M. A.; HEIMANN, K.; BROWN, R. J. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 1160-1170, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.041>.

JUÁREZ, J. M. HERNANDO, A. L.; TORRE, R. M.; LANZA, S. B.; RODRÍGUES, S. B. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 265-271, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>.

KANEMOTO, F. T. **Otimização de sistema de cultivo de baixo custo de *Nannochloropsis gaditana* Lubián 1982 para produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia: Instituto de Oceanografia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LEITE, R. C. DE C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos - CEBRAP**, n. 78, p. 15-21, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-33002007000200003>.

LI, Y. HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 1, p. 815-820, 2008. <https://doi.org/10.1021/bp.070371k>.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600044>.

LUBIANA, K. M. F. Microalgas: ecologia, biodiversidade e importância. **IV Botânica no Inverno**, n. July 2014, 2014.

MALLICK, N. MALLICK, N.; MANDAL, S.; SINGH, A. K.; BISHAI, M.; DASH, A. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 137-145, 2012. <https://doi.org/10.1002/jctb.2694>

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; MELO FRANCO, P. I. B.; ANTONIASI FILHO, N. R.; SANT'ANA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da

potencialidade de microalgas Dulcícolas como Fonte e Matéria-Prima Graza Para a Produção de Biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000100003>

OHSE, S.; DERNER, R.; OZÓRIO, R. Á. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 6-18, 2008. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2008v21n2p7>

OLIVEIRA, A. C. DE. **Produção de Biomassa de Microalgas *Scenedesmus* sp. Em Efluente de Bovinocultura Biodigerido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: Setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

OSAKI, M.; BATALHA, M. O. **Produção de Biodiesel e Óleo Vegetal no Brasil: Realidade e Desafio**. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia. Rio Branco, 2008.

PERIN, G.; BELLAN, A.; SEGALLA, A.; MENEGHESSO, A.; ALBORESI, A.; MOROSINOTTO, T. **Generation of random mutants to improve light-use efficiency of *Nannochloropsis gaditana* cultures for biofuel production**. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0337-5>.

PIRES, J. C. M. COP21: The algae opportunity? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 867-877, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.197>.

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>.

RUSCHEL, C. F. C. **Avaliação das Propriedades Físico- Químicas de Blendas de Óleo Diesel e Biodiesel**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial - Instituto de Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre), 2010.

SALAMA, E. S. HURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A.I.; EL-DALATONY, M. M.; YANG, I. S.; MIN, B.; JEON, B. H. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 1189-1211, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>

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**. Tese (Doutorado em Planejamento Energético: Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SANTOS, B. **Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: Setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SANTOS, C. S. DOS; COSTA, T. M. F. DA. **Automação no cultivo de microalgas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia e Controle de Automação), Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, 2016.

SANTOS, L. E. DA S. DOS. **Minimização De Emissões De Óxidos De Nitrogênio (Nox ) Pelo Uso De Fotocatálise e Biofixação Por Microalgas**. Dissertação (Pós Graduação em Meio Ambiente Urbano e Industrial: Departamento de Engenharia Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

SU, Y.; SONG, K. ZHANG, P. SU, Y.; CHENG, J. CHEN, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. October 2015, p. 402-411, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.078>

U.S. EIA. Annual Energy Outlook 2019 with projections to 2050 Annual Energy Outlook 2019 with projections to 2050. Disponível em: <<https://www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/aeo2019.pdf>>.

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. **Engvista**, v. 21, n.2, p.242-255.

VENÂNCIO, H. C. **Produção da Microalga *Scenedesmus obliquus* em um Sistema Laminar de Cultivo de Algas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

VENDRÚSCOLO, J. B. G. **Cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em efluentes de biodigestão de aves e suínos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Aquicultura Continental: Mestrado Profissional - Tecnologia em Aquicultura Continental), Goiânia, 2009.

VILLELA, H. D. M. **Utilização das Técnicas de Engenharia Genética e Bioquímica em *Chlamydomonas reinhardtii* Visando o Aumento da Produção de Lipídeos para Obtenção de Biocombustível**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica: Instituto de Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

WOJCIECHOWSKI, J.; STRAUBE, A.; CAVALCANTE, K. P.; MIRANDA, F. E. Isolamento e cultivo de microalgas. **Thenical report**, n. September 2013, p. 85, 2013.

YU, X.; CHEN, L.; ZHANG, W. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00056>.