



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



JAQUELINE ELISE GARCIA CHIESA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO NAS MICROALGAS *SCNEDESMUS SP.* E *CHLORELLA SP.* MEDIANTE A
POTENCIALIZAÇÃO DE TEOR LIPÍDICO.

UBERLÂNDIA
2019

JAQUELINE ELISE GARCIA CHIESA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO DAS MICROALGAS SCNEDESMUS SP. E CHLORELLA SP. MEDIANTE A
POTENCIALIZAÇÃO DE TEOR LIPÍDICO.

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira
Batista

UBERLÂNDIA
2019

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

C533 2019	<p>Chiesa, Jaqueline Elise Garcia, 1993- AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS MICROALGAS SCNEDESMUS SP. E CHLORELLA SP. MEDIANTE A POTENCIALIZAÇÃO DE TEOR LIPÍDICO. [recurso eletrônico] : AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS MICROALGAS SCNEDESMUS SP. E CHLORELLA SP. MEDIANTE A POTENCIALIZAÇÃO DE TEOR LIPÍDICO. / Jaqueline Elise Garcia Chiesa. - 2019.</p> <p>Orientador: Antônio Carlos Ferreira Batista. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biocombustíveis. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.17 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biocombustível. I. Batista, Antônio Carlos Ferreira, 1973-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biocombustíveis. III. Título.</p>
CDU: 662.756	

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



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis			
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 37, PPBIC			
Data:	20 de dezembro de 2019	Hora de início:	8:30	Hora de encerramento: 10:39
Matrícula do Discípulo:	11722PGB007			
Nome do Discípulo:	Jaqueline Elise Garcia Chiesa			
Título do Trabalho:	Avaliação dos efeitos causados pelas diferentes condições de cultivo das microalgas <i>scenedesmus sp.</i> e <i>chlorella sp.</i> mediante a potencialização de teor lipídico.			
Área de concentração:	Biocombustíveis			
Linha de pesquisa:	Biomassas energéticas: ciência e tecnologia			
Projeto de Pesquisa de vinculação:				

Reuniu-se no Auditório 1, Campus Pontal, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta: Professores Doutores: Rosana Maria Nascimento de Assunção, da Universidade Federal de Uberlândia; Wesley da Silva Borges, do Instituto Luterano de Ensino Superior; e Antônio Carlos Ferreira Batista, orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

[A]provado(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 20/12/2019, às 10:40, 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 **Rosana Maria Nascimento de Assunção, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/12/2019, às 10:41, 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 20/12/2019, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1726906** e o código CRC **4BB65585**.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Marilene Garcia Veloso, por todo apoio, todas as orações e palavras de animo principalmente nos momentos de incerteza de desanimo, medo e incertezas. Sem você eu não teria chegado ate aqui. Obrigada mãe, por me mostrar a cada dia o poder da fé da oração e da persistência.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, obrigada por me permitir viver essa oportunidade, me dando força, e afago em todos os momentos.

Ao meu filho Thomas Andrew, iniciou o mestrandão ainda dentro da minha barriga, depois que nasceu, esteve comigo em todas as aulas, e apesar de ser ainda tão pequeno, é o responsável por toda minha persistência, força, e vontade de vencer, obrigada por ser minha luz.

Ao meu orientador, Antônio Carlos Ferreira Batista (Flash), minha eterna gratidão pela oportunidade de realizar este projeto ao lado de pessoas que tanto contribuíram para meu crescimento. Meu muito obrigada por toda paciência, compreensão e apoio, deixo aqui expressa toda minha admiração por todo o auxílio em me passar os mais sábios conhecimentos e por toda a disponibilidade.

A Isabela de Souza Dias, minha eterna gratidão por todo suporte em um momento muito importante, obrigada por toda paciência, disponibilidade, companheirismo e pro atividade, e todas as trocas de conhecimento, muito importantes para o trabalho.

Aos meus eternos amigos Flavia Costa Oliveira, e Witter Duarte Guerra, meu muito obrigada, vocês são os grandes responsáveis por tudo até aqui conquistado, me forneceram desde o início palavras de encorajamento, prontidão, apoio fundamental com os experimentos, todas as dificuldades que encontrei nesse caminho, vocês estavam ali, para dizer que tudo daria certo, mas acima de tudo obrigada pela grande amizade, esse título não é só meu, mas sim de todos nós.

A toda minha família, esposo, pais, irmãos, sou toda gratidão pela torcida e orações, e todo esforço, que me ajudaram a chegar até aqui.

Em especial ao meu sogro, que esteve sempre disposto a ajudar, sabendo que seu auxílio foi de extrema importância, para que eu chegassem até aqui, sou eternamente grata.

Ao professor Guimes Rodrigues Filho, devo meu muito obrigada, por tamanha compreensão, palavras de encorajamento, e fé, em um momento na qual tanto precisei, você foi um grande responsável por minha perseverança. Se estendendo também a todos os professores do PGB-UFU que fizeram parte da edificação do meu conhecimento.

Aos professores e doutores, Wesley Borges, Anízio Faria, Lucas, e Rosana Assunção meus eternos agradecimentos, por toda disponibilidade, repasse de conhecimento, auxilio, paciência e compreensão, além de fornecer os materiais e equipamentos para a realização deste trabalho. Por fim a Andressa Tironi, meu muito obrigada pela paciência, disponibilidade, auxilio com as análises estatísticas transmitindo segurança e persistência.

*“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.
Amém.”*

- Romanos 11:36

RESUMO

Os biocombustíveis são definidos comumente como um combustível derivado de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica morta que não esteja fossilizada, e também proveniente de produtos metabólicos de organismos vivos, como, por exemplo, óleo vegetal para a produção de biodiesel. Dentro as matérias primas utilizadas para produção do biodiesel, encontra-se as microalgas que vem sendo apontada como uma alternativa promissora de matéria prima, em relação as demais. Nesse contexto o presente estudo tem como objetivo otimizar as condições de cultivo das microalgas *Chlorella sp* e *Scenedesmus sp*, além de verificar o crescimento dessas espécies, quando cultivas em diferentes concentrações de nitrato, ferro, zinco e biotina. O cultivo e manutenção do inóculo, ocorreu em reatores planos horizontais em acrílico, mantidos em temperatura ambiente DE 25 a 30°C ± 1°C, com controlador de fotoperíodo em 12 horas de luz e 12 horas de escuro, utilizando três lâmpadas fluorescentes brancas de 40w foi utilizado em meio sintético Chu. Diferentes concentrações de nutrientes, adição de biotina ,e espécies distintas de microalgas foram as variáveis otimizadas para o crescimento das algas e rendimento lipídico. Assim para que o tempo e número de experimentos fosse reduzidos utilizou-se planejamento fatorial 2³e o planejamento composto central. Após a realização dos testes preliminares e da primeira etapa do modelo experimental adotado, os resultados indicaram que a metodologia experimental para o cultivo de microalga *Chlorella sp.*, apresentou melhores rendimentos no teor lipídico, quando submetidos ao cultivo em meio Chu com redução dos nutrientes nitrato e ferro com adição de biotina. atingindo um valor máximo de 51,54% de teor lipídico, verificou-se ainda que a quantidade de dias (tempo) apresentou tendência de maior acúmulo de lipídeos em 20 dias de cultivo. Sendo necessário dar seguimento aos experimentos em busca de melhorar ainda mais as condições de cultivo empregadas, possibilitando melhores resultados nos ensaios em geral.

Palavras-chave: *Chlorella sp*, microalgas; *Scenedesmus sp.*; lipídeos.

ABSTRACT

Biofuels are commonly used as a fuel derived from biological materials, including non fossilized dead organic matter, and also likely from metabolic products from living organisms, such as vegetable oil for biodiesel production. Among the raw materials used for biodiesel production, it is found as microalgae that has been pointed as a promising alternative of raw material, in relation to others. In this context, the present study aims to optimize the cultivation conditions of the microalgae *Chlorella* sp and *Scenedesmus* sp, besides verifying the growth of these species when cultivated at different levels of nitrate, iron, zinc and biotin. The cultivation and maintenance of the inoculum, which occurred in the restoration of horizontal acrylic planes, kept at room temperature of 25 a 30° C, with photoperiod driver at 12 hours of light and 12 hours of dark, using three white fluorescent lamps of 40w was used in chu synthetic medium. Different nutrients, biotin addition and distinct microalgae species were selected as optimized for algal growth and lipid yield. Thus, to reduce the time and number of experiments, use factorial design 23e or central composite design. After the preliminary tests and the first stage of the adopted experimental model, the results indicate that the experimental methodology for the cultivation of microalgae *Chlorella* sp., Shows better results in the lipid content when carried out in the bath with nitrogen reduction. and iron with biotin addition. reaching a maximum value of 51.54% of lipid content, verified even with a number of days (time) showing the tendency of lipid volume increase in 20 days of cultivation. It is necessary to follow up the experiments in search of further improving the cultivation conditions employed, to enable better results in the tests in general.

Keywords: *Chlorella* sp, microalgae, *Scenedesmus* sp., lipids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Potenciais da biomassa algácea: fontes de energia, produtos e aplicações	28
Figura 2 - Morfologia microscópica da Microalga do gênero <i>Scenedesmus sp</i>	28
Figura 3 - Microalga do gênero <i>Chlorella sp</i>	29
Figura 4 - Condições laboratoriais de cultivo das microalgas.....	42
Figura 5 - Espectrofotômetro Shimadzu, uv-1800, usado para medição de crescimento celular.	43
Figura 6 - Estufa utilizada para secagem de biomassa das microalga	44
Figura 7 - Esquema de extração de óleo das microalgas <i>Chlorella</i> e <i>Scenedesmus sp</i> . utilizando, cadrinho, banho ultrassônico e centrífuga, seguindo para funil de separação. ...	46
Figura 8 - Analise de Crescimento celular.	49
Figura 9 - Gráfico normal de efeitos para o cultivo das algas. Sendo que 1 corresponde ao meio de cultivo, 2 ao tempo de cultivo e 3 à porcentagem de inóculo.....	53
Figura 10 - Superfície de respostas para o teor lipídico produzido por algas <i>Chlorella sp</i> . obtida seguindo o planejamento composto central. x^1 é o valor codificado para.... e x^2 é o valor codificado para	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagens de emissões de poluentes da queima do biodiesel comparadas com as emissões da queima do óleo diesel de petróleo	20
Tabela 2- Comparação do teor de óleo, produtividade de óleo, área de produção e produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais e com diferentes espécies de microalgas.....	22
Tabela 3- Vantagens na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis.....	24
Tabela 4- produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais com microalgas.....	22
Tabela 5- vantagens e desvantagens de cada tecnologia utilizada para o crescimento das microalgas.....	37
Tabela 6- Meio de Cultivo Chu.....	41
Tabela 7- Variáveis e níveis estudados para a otimização do processo de produção frente ao cultivo de microalgas.....	44
Tabela 8- Matriz do planejamento experimental fatorial 23, para variações no meio de Cultivo. Variáveis: M: Meio de Cultivo, T: Tempo de cultivo em dias e I: Porcentagem de Inóculo.....	45
Tabela 9- Variáveis e níveis da otimização do teor lipídico.....	47
Tabela 10- Matriz de planejamento composto central em 2 variáveis para otimização do teor lipídico (1- Concentração de zinco no meio Chu em porcentagem (%) e 2 – inserção debiotina em diferentes concentrações.....	48
Tabela 11- Porcentagem de teor lipídico de acordo com o planejamento fatorial 2^3	51
Tabela 12- Efeitos das variáveis estudadas e suas interações.....	52
Tabela 13- Biomassa seca e quantidade de óleo produzido por reator e teor Lipídico.....	54
Tabela 14- Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e teor lipídico das microalgas <i>Chlorella sp.</i> em processo de otimização de cultivo	55
Tabela 15- Análise de variância para o modelo estatístico ajustado ao teor de lipídeos obtido na produção da microalga <i>Chlorella sp</i>	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS	16
	Objetivos Específicos:	16
4	REFERENCIAL TEÓRICA	17
	Biocombustíveis	17
	Biodiesel	18
	Lipídios.....	26
	<i>Scenedesmus sp</i>	27
	<i>Chlorella sp.</i>	28
	Condições Nutricionais	30
	Nitrogênio.....	35
	Crescimento das Microalgas.....	36
	Aeração	39
	pH – Potencial Hidrogeniônico.....	39
	Temperatura	40
	Iluminação	40
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	41
	Microalgas Chlorella e Scenedesmus.....	41
	Meio de Cultura	41
	Condições de técnicas do cultivo.....	42
	Leitura de crescimento celular e biomassa seca	42
	Extração de Lipídeos segundo Folch Less e Sloane Stanley	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
	Avaliação de crescimento das microalgas Chlorella sp. e Scenedesmus sp.....	48
	Ensaios realizados para otimização no cultivo de microalgas	49
	Biomassa seca e teor lipídico produzido	52
	Otimização das condições de cultivo.....	54
7	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

A contínua exploração dos combustíveis fósseis como principal fonte de energia nas diferentes atividades causadas pelo homem, proporciona um dos maiores desafios da humanidade. Tratando-se de recursos limitados, a inevitável escassez dos combustíveis fósseis conduz à procura de fontes alternativas de energia, que acarretem um menor impacto ambiental (Mata et al., 2010).

A limitação da emissão de gases com efeito de estufa e que têm conduzido ao aquecimento global, com consequências nefastas para o Homem, passará também pela substituição gradual das atuais fontes energéticas por energias alternativas (Demirbas and Demirbas, 2011; Pittman et al., 2011).

Surge então o biocombustível que é definido comumente como um combustível derivado de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica morta que não esteja fossilizada, e também proveniente de produtos metabólicos de organismos vivos, como, por exemplo, óleo vegetal para a produção de biodiesel (Dermibas, 2009).

De modo geral, o conceito de biocombustível considera tanto combustíveis sólidos quanto líquidos, bem como gases. Exemplos de biocombustível sólido são: madeira, resíduos de agricultura, como casca de arroz, e exemplos de líquidos são os, mais conhecidos, o etanol, proveniente da fermentação alcoólica da cana de açúcar, e o biodiesel, que possui como, matéria prima para a sua produção, diversos tipos de óleos vegetais oriundos dos mais diversos tipos de cultivo, como, por exemplo, soja, amendoim e sebo bovino. (AZEREDO, 2012).

A primeira grande demanda a nível internacional por biocombustíveis ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial, onde os biocombustíveis eram alternativas ao combustível importado. Após o fim da Segunda Guerra, o petróleo barato, oriundo do Oriente Médio, passou a tomar conta do cenário mundial de consumo de combustíveis. Até que, na década de 70, devido às instabilidades políticas e constantes guerras no Oriente Médio, ocorreu o primeiro choque do petróleo. (AZEREDO, 2012).

Porém, uma questão que muitos entoam contra os biocombustíveis é a relação combustíveis *versus* alimentos. Argumenta - se que há uma competição por áreas entre os alimentos e os biocombustíveis, e que os últimos veem ganhando cada vez mais espaço em detrimento dos primeiros. Outra questão importante no que concerne à sustentabilidade da produção dos biocombustíveis é a questão do desmatamento, principalmente em países com

florestas tropicas que estão sendo derrubadas para dar lugar às plantações energéticas. (Kohlhepp 2010.)

Com isso a biomassa (*i.e.*, matéria orgânica continuamente renovável, como cereais, árvores, algas e resíduos de origem vegetal e animal) como matéria-prima para a produção de biocombustíveis apresenta-se como uma das potenciais soluções (Demirbas, 2001; Kamm et al., 2006).

Neste contexto, o uso de microalgas como biomassa para a produção de biodiesel e outros produtos tem se mostrado uma alternativa promissora em termos de produção e aceitabilidade, apresentando diversas vantagens, com relação as demais matéria primas.

Porém existem muitos desafios e barreiras técnicas à implementação de um processo comercial viável para produzir biocombustíveis baseados em algas. Os biocombustíveis feitos a partir das microalgas devem passar por uma série complicada de processos unitários de cultivo, colheita, desidratação, extração de óleo, conversão e outras etapas, gerando altos custos de produção. Assim o presente estudo busca alternativas que condições de cultivo que poderiam maximizar a produção e reduzir gastos. (SHI, 2018)

2 JUSTIFICATIVA

A principal justificativa deste trabalho baseia-se na necessidade de investimento em pesquisas que traz alternativa de combustível sustentável, como o biocombustível que é um combustível derivado de materiais biológicos. (Dermibas, 2009).

Além disso os estudos apontam que o uso das microalgas como matéria prima para produção de biodiesel, oferece vários benefícios em geral, com isso o melhoramento das condições de crescimento das microalgas poderia maximizar a produção de biomassa em densidade celular e aumentar de produção lipídica, consequentemente, aumentando as possibilidades e viabilidades de se produzir biodiesel em larga escala com o uso dessas microalgas ESPINOSA *et al.*, (2014).

Nesse contexto se faz necessário a otimização das condições, e meios de cultivo, testando diferentes concentrações de nutrientes e vitaminas, que são primordiais para o crescimento da microalgas, com intuito de aumentar a produção em teor lipídico, tornando a produção de biodiesel, através dessa matéria prima, cada vez mais viável.

3 OBJETIVOS

Otimizar as condições de cultivo das microalgas *Chlorella sp* e *Scenedesmus sp*, para obtenção da máxima produção lipídica, visando tornar possível a produção em larga escala de biodiesel.

Objetivos específicos

Observar se as distintas espécies de microalgas apresentaram rendimentos diferentes uma da outra, quando inseridas as mesmas condições de cultivo.

Avaliar se o tempo de cultivo de 30 dias, é o mais recomendado para essas espécies de microalgas quando inseridas a essas condições de cultivo.

Observar o rendimento de óleo, quando adicionado a vitamina biotina em diferentes concentrações no em seu meio de cultivo.

Verificar o rendimento em teor lipídico, das microalgas quando submetidas a diferentes concentrações de nitrato, ferro e zinco em seu meio.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Biocombustíveis

A combustão crescente de combustíveis fósseis tem proporcionado, junto com o desmatamento, o acúmulo de gases poluentes na atmosfera, particularmente de CO₂, responsáveis pelo efeito estufa e pelas consequências nas alterações climáticas. Esse atual quadro exige mudanças dos padrões de industrialização e de consumo da sociedade humana, com intuito de reduzir a emissão de gases de efeito estufa (SILVA *et al.*, 2011).

Embora as “crises de petróleo” dos anos 1970, que causou um grande aumento do preço do petróleo tenham sido episódicas, a conjunção e sinergia dos fatores acima mencionados, indicam uma tendência crescente e irreversível no aumento do preço e na diminuição do seu uso (PEREIRA *et al.*, 2008).

Em busca de reduzir os riscos de crises no setor energético no Brasil, que retardem o crescimento econômico e desenvolvimento socioambiental do mesmo, é primordial que haja investimentos em fontes energéticas mais limpas e complementares, como a biomassa, para manutenção da matriz nacional. Diante disto, procurou-se compreender a problemática da potencialidade energética que a biomassa possui como fonte provedora de energia para o Brasil. Ao analisar a matriz energética brasileira atual, foi possível constatar a premência de renovação da mesma, que historicamente tornou-se dependente de fontes energéticas não renováveis (como o petróleo e seus derivados, o carvão mineral, o gás natural), consideradas finitas e prejudiciais ao meio ambiente. (LOPES, 2019)

Neste contexto, o interesse na diversificação da matriz energética com fontes de energia renováveis, como os biocombustíveis, está mobilizando nacional e internacionalmente e de forma única os setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos sobre o tripé de sustentabilidade ambiental, social e econômica. (Nascimento 2012)

O Biocombustível é definido comumente como um combustível derivado de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica morta que não esteja fossilizada, e também proveniente de produtos metabólicos de organismo vivos, como, por exemplo, óleo vegetal para a produção de biodiesel (Dermibas, 2009).

Dentro dos biocombustíveis temos o biodiesel que tem como, matéria prima para a sua produção: soja, amendoim, sebo bovino, Algodão, girassol, milho e também a partir de microorganismos como as microalgas. Usado em motores a combustão interna com ignição por compressão ou para geração de outro tipo de energia (BRASIL, Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005).

Uma estimativa acerca dos biocombustíveis apresenta que o petróleo permanecerá a crescer até o ano de 2030, entretanto, um forte crescimento dos biocombustíveis fará com que este assuma o domínio de dois terços da demanda de combustíveis líquidos no ano de 2060. A inserção obrigatória dos biocombustíveis em uma mistura com os combustíveis convencionais também influencia o crescimento desta fonte de energia, e os altos preços da extração do petróleo nos oceanos se dão como um incentivo para a produção do biodiesel (OCAMOTO, 2019).

Biodiesel

Na Resolução ANP nº 14 de 11/05/2012, encontra-se delineada a definição de biodiesel como sendo um combustível composto de álquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, produzido a partir de uma reação química entre óleos ou gorduras animais ou vegetais e um álcool, que pode ser o metanol ou o etanol (ANP, 2014)..

O biodiesel é um biocombustível líquido derivado de biomassa renovável não particulado, sendo considerado um combustível diesel alternativo: podendo assim ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação (DELATORRE *et al.*, 2011).

Derivado de fontes renováveis, tais como óleo vegetal, gordura animal, ou gorduras residuais, que são fontes de lipídeos que, na presença de um catalisador, reagem com álcool etílico ou metílico dando origem a um combustível de alta qualidade (GERIS *et al.*, 2007; DELATORRE *et al.*, 2011; FERNANDES JR. *et al.*, 2012).

Segundo DELATORRE *et al.* (2011), comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas; também reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre.

Por serem originados dos ácidos graxos lineares, o biodiesel não contém aromáticos, produtos amplamente conhecidos como cancerígenos e que estão presentes nas emissões da queima de óleo diesel mineral, cuja combustão é incompleta. No caso do biodiesel sua combustão é mais completa, reduzindo os teores de monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (CH) não queimados e material particulado (MP). Além de ser isento de contaminantes como o enxofre (FERRÉS, 2012). A Quadro 1 apresenta características complementares freqüentemente atribuídas ao biodiesel, em comparação com o diesel convencional.

Quadro 1. Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

Características	Propriedades complementares
Características químicas apropriadas	Livre de enxôfre e compostos aromáticos, alto número de cetanos, ponto de combustão apropriado, excelente lubricidade, não tóxico e biodegradável
Ambientalmente benéfico	Nível de toxicidade compatível ao sal ordinário, com diluição tão rápida quanto a do açúcar (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
Menos poluente	Reduz sensivelmente as emissões de (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxidos sulfúricos e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Economicamente competitivo	Complementa todas as novas tecnologias do diesel com desempenho similar e sem a exigência da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento
Reduz aquecimento global	O gás carbônico liberado é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera
Economicamente atraente	Permite a valorização de sub-produtos de atividades agro-industriais, aumento na arrecadação regional de ICMS, aumento da fixação do homem no campo e de investimentos complementares em atividades rurais
Regionalizado	Pequenas e médias plantas para produção de biodiesel, podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria prima disponível em cada local.

Fonte: Neto; 2000.

Além de todos as características apresentadas no Quadro 1, pode-se também observar na **Tabela 1** que em relação ao diesel proveniente do petróleo, o biodiesel puro emite uma quantidade expressivamente menor de poluentes com relação aos demais combustíveis, sendo menos (valor negativo) e mais (valor positivo) de poluentes são emitidos a partir da queima do biodiesel puro (B100) e de suas diferentes misturas

(B5 e B20) em comparação com as emissões provenientes da queima do óleo diesel de petróleo. (Kohlhepp 2010.)

Tabela 1- Porcentagens de emissões de poluentes da queima do biodiesel comparadas com as emissões da queima do óleo diesel de petróleo.

POLUENTES	B5(mistura)	B20 (mistura)	B100 (puro)
CO	-7	-15	-48
CO₂	-7	-9,5	-78
HC	-5	-20	-67
MP	-8	-15	-47
SO_x	-5	-20	-100
NO_x	<1	2 a 4	10 a 20

Adaptado de FERRÉS (2012).

A produção do biodiesel é geralmente baseada na transesterificação de base, em princípio a matéria prima deve ter o mínimo de acidez e umidade, sendo realizado um processo de neutralização o que requer um passo de purificação que envolve lavagens sucessivas com água para neutralizar o catalisador e eliminar impurezas. (KLOCK et al., 2015.)

As principais matérias-primas utilizadas no Brasil para a produção do biodiesel são o óleo de soja, gordura bovina e óleo de algodão (ANP, 2014). Com menores participações encontram-se o óleo de fritura, gorduras de porco e de frango, óleo de palma, óleo de canola e outros materiais graxos. Dentre os outros óleos que também podem ser empregados, encontram-se os de mamona, amendoim, macaúba, babaçu e camelina (FERRARI et al., 2005). Todavia, o óleo de soja é a matéria-prima mais utilizada, com participação de aproximadamente 70%.

Nesse contexto apesar destes combustíveis poderem ser obtidos a partir de matérias-primas simples e de baixo valor agregado, ainda existem algumas restrições quanto ao seu uso e comercialização no Brasil. Argumenta-se que há uma competição entre biocombustíveis e alimentos e que os últimos veem ganhando cada vez mais espaço em detrimento dos primeiros. Outra questão importante no que concerne à sustentabilidade da produção dos biocombustíveis é a questão do desmatamento, principalmente em países com florestas tropicais que estão sendo derrubadas para dar lugar às plantações energéticas. (GUIMARÃES, 2015).

Assim se faz necessário a busca de alternativas que tornem o uso do biodiesel mais viável e eficaz. Uma das matérias primas utilizadas para produção de biodiesel como citado acima são as microalgas que

apresenta um enorme potencial e que vem sendo objeto de estudo para fins energéticos, principalmente pelos Estados Unidos, através do Programa de Espécies Aquáticas desde a década de 70 (FRANCO; 2013).

Sob esse aspecto as microalgas apresentam inúmeras vantagens enquanto matéria prima para a produção do biodiesel - GOUVEIA, et al. 2015 traz uma lista de vantagens da utilização das microalgas como matéria prima para a produção de biodiesel.

- Não requererem terras agricultáveis, podendo ser cultivada em região desértica e em solo degradado; Não competem com a agricultura;
- Embora cresçam em meio aquoso, consomem menos água do que plantas terrestres e a água residual pode ser reutilizada no processo;
- Sua produção pode ser realizada durante todo o ano, não seguindo o regime de safras;
- Apresentam alta produtividade em biomassa e rápido acúmulo de lipídeos;
- Podem produzir mais da metade do oxigênio da natureza; seu cultivo não exige a aplicação de agrotóxicos;
- Os nutrientes para seu cultivo podem ser obtidos a partir de águas residuais e resíduos agroindustriais;
- São eficientes fixadoras de carbono atmosférico, ou mesmo o residual de processos industriais, através da fotossíntese (cada tonelada de biomassa produzida consome 1,83 tonelada de CO₂, 10 – 20 vezes mais que o absorvido pelas plantas oleaginosas);
- Podem produzir uma série de outros produtos valiosos além de lipídeos, tais como proteínas, carotenóides e carboidratos, que podem ser utilizados como alimento ou fertilizantes, fermentados para produzir etanol ou outro produto com maior valor agregado.

Além disso embora as microalgas apresentem uma porcentagem lipídica inferior às demais matérias primas apresentadas, seu rendimento de óleo pode atingir uma importância significativa diante da alta produtividade conforme mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2- Comparação do teor de óleo, produtividade de óleo, área de produção e produtividade em biodiesel das matérias-primas de biodiesel tradicionais e com diferentes espécies de microalgas.

Matéria Prima	Teor de óleo (%)	Produtividade e de óleo	Área de produção (m ² .ano ⁻¹ .kg ⁻¹ de biodiesel)	Produtividade em biodiesel (kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Pinhão	28	741	15	656
Canola	41	1190	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Mamona	48	1307	9	1156
Palma	36	5366	2	4747
Microalgas	70	136900	0,1	121104

Fonte: Adaptado de Mata et. al., (2010)

Microalgas

As microalgas e as cianobactérias, assim como ocorreu no passado, apresentam potencial para através da fotossíntese captar CO₂ da atmosfera, liberar oxigênio, que é vital para a manutenção da vida no planeta, e assim, minimizar os efeitos negativos da liberação de grande quantidade de CO na atmosfera (BRAGA et. al., 2003).

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos que podem fixar o CO₂ de diferentes fontes e sob condições adequadas de cultivos são capazes de produzir carboidratos, proteínas, lipídeos e compostos de valor agregado como ácidos graxos e carotenóides de interesse para a área de alimentos. (GONÇALVES, 2019)

Além da capacidade de absorção do CO₂ excedente, segundo Demirbas (2011), as microalgas parecem ser a única fonte de biodiesel renovável que é capaz de atender a demanda global por combustíveis utilizados no setor de transportes. Porém, os custos de produção do biodiesel de microalgas ainda não o torna competitivo no mercado.

Desde o início do cultivo de microalgas em larga escala em meados da década de 40, a biomassa produzida vem sendo destinada às mais diversas aplicações comerciais, como produção de proteína unicelular, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas. Hoje, o

principal interesse é o cultivo com vistas à produção de biocombustíveis, com destaque para o biodiesel e para o biohidrogênio. (ACIOLI, 2014)

Na maioria das tecnologias de conversão da biomassa microalgal o principal substrato para a produção de lipídeos são os carboidratos, ao mesmo tempo em que podem limitar o uso das microalgas nessas tecnologias. O alto conteúdo proteico das células de microalgas é outro fator que também pode limitar o uso da biomassa algácea. Porém, a composição dessa biomassa pode ser modificada drasticamente com a utilização de várias técnicas de cultivo, que envolve, principalmente, limitação e/ou excesso de nutrientes, privação total de nutrientes, intensidade luminosa, pH, temperatura e as combinações destes e de outros fatores (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012).

Os lipídeos produzidos podem ser convertidos em biodiesel, entretanto, utilizar microalgas para produzir biodiesel requer de 55 à 111 vezes mais nutrientes nitrogenados, mesmo com uma produção de óleo de 10 a 20 vezes maior que as culturas terrestres. (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010).

As microalgas apresentam características diversas, como: podem ser unicelulares, coloniais e filamentosas; sendo assim chamadas de ubiquitárias, estão distribuídas principalmente nos ambientes aquáticos, desde rios de água doce (90 %) até lagos salgados, mas também são encontradas em solos terrestres; podem ou não apresentar motilidade; podem viver em associação simbiótica, entretanto a maioria é de vida livre; e têm tolerância para uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez e concentração de O₂ e CO₂ (LEE *et al.*, 2008).

Este grupo heterogêneo está entre os mais antigos do planeta e constituem a base da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos, sendo os principais organismos fotoautotróficos produtores de carbono orgânico nos mares e águas de interiores (CHISTI, Y., 2007; REYNOLDS, 2006).

As espécies de microalgas, *Scenedesmus sp* e *Chlorella sp*, vêm sendo apontadas nos últimos anos entre as mais eficientes no processo de fixação de CO₂ acoplado ao tratamento de águas residuais e à síntese de lipídeos para a produção de biodiesel (BLERSCH *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2012; XIN *et al.*, 2010).

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; mixotrópicos, 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. .

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 CO₂. Elas podem ser usadas para produção de biocombustíveis, obtenção de pigmentos, tratamento de efluentes industriais e esgoto.

De acordo com a Tabela 3, fica claro que as microalgas apresentam muitas vantagens em relação às culturas de vegetais superiores. Porém, também apresentam desvantagens, com destaque aos altos custos de produção em larga escala, e problemas relacionado a baixa concentração de microalgas no ambiente natural. Estresse nutricional, competição, predação e infestação de diversos gêneros de microalgas são os principais fatores relacionados à baixa concentração de microalgas na natureza, concentrações estas que não suportam exploração comercial. Porém, podem ocorrer naturalmente em concentrações maiores, ocasionando os chamados blooms ou florações. (ACIOLI , 2014)

Tabela 3- Vantagens na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis.

VANTAGENS	REFERENCIAS
Alta taxa de crescimento, sendo muito superior àquelas apresentadas pelas culturas terrestres;	Demirbas, 2010. Demirbas, 2010.
Podem ser cultivadas em áreas impróprias para a agricultura;	Demirbas, 2010. Demirbas, 2010
Alta eficiência na mitigação de CO ₂ ;	Demirbas, 2010. Demirbas, 2010.
Maior rentabilidade do que as culturas terrestres	Demirbas, 2010. Demirbas, 2010.
Organismos que apresentam maior eficiência na conversão da energia solar em energia química. Não competem com as culturas aráveis por terras aráveis.	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012
A fertilidade do solo não é requisito para o cultivo, visto que são cultivadas em meio aquático. Podem ser cultivados com simples exigências nutricionais	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012
Se forem utilizadas microalgas marinhas, não há a necessidade dos suplementos valiosos que são requeridos quando o cultivo é realizado em água doce.	Williams & Laurens, 2010.
O impacto ecológico negativo é bastante reduzido quando comparado com os vegetais superiores.	Williams & Laurens, 2010.
O cultivo pode ser realizado juntamente com o tratamento de águas residuárias	Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012

Nesse sentido, ao longo dos anos, várias tentativas foram feitas com o intuito de explorar tecnologias de produção de microalgas tanto para produção dos biocombustíveis quanto para alimentação, lipídios, vitaminas, pigmentos, fertilizantes, produtos farmacêuticos e outros produtos químicos especiais. Este interesse comum surgiu como resultado da necessidade de fornecimento de alimentos adicionais, aumentando os problemas de eliminação de resíduos e à escassez de matérias-primas e recursos energéticos. Nesse contexto, métodos de produção de algas em larga escala foram desenvolvidos e dependem da interação de fatores internos e externos. Becker (2008) As principais fontes de energia e os principais produtos oriundos da biomassa algácea estão na Figura 1.

Figura 1 - Potenciais da biomassa algácea: fontes de energia, produtos e aplicações.



Fonte: BECKER, 2008.

4.3 Lipídios

A maior fração de lipídios está inserida nos ácidos graxos compreendendo entre 25 a 60 % dos lipídios totais. O conteúdo lipídico nesses organismos varia em média entre 10 a 40 % em certas condições, podendo alcançar mais de 50 % do peso seco. Entretanto, encontra-se nos casos com maiores teores lipídicos uma baixa produção de biomassa, sendo necessário otimizar as condições que favoreçam ambas variáveis, altas densidades de células e teores de lipídeos (CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010).

Os lipídeos neutros estocam energia para a célula, enquanto os lipídeos polares, glicolipídeos e os fosfolipídeos são partes estruturais de membranas celulares, além de participarem de atividades de modulação. A síntese de ácidos graxos nas microalgas é inicialmente dirigida à formação das membranas celulares, organelas, cofatores enzimáticos, transportadores, mensageiros intracelulares e lipídeos de reserva. Mas, como já foi citado, o conteúdo lipídico pode variar de acordo com a espécie, nutrição, época e estágio de crescimento da alga (DERNER *et al.*, 2006; NARENDRA *et al.*, 2010).

A escolha do método de extração dos lipídeos, localizado no interior da célula, é de fundamental importância para aumentar a eficiência do processo como todo (LEE *et al.*, 2010).

As células das microalgas são ricas em ácidos graxos com alto teor lipídico, suas cadeias entre 14-20 carbonos apresentam características físico-químicas semelhantes ao óleo produzido por outros vegetais

sendo promissores a produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biometano). A composição lipídica da biomassa algal é a base de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados e insaturados e pode modificar entre as espécies de acordo com as condições ambientais de cada espécie e seu crescimento celular, atingindo um teor lipídico que pode variar entre 01 a 70 % (Colgo, 2017). A **Tabela 4** traz algumas das espécies mais utilizadas pra obtenção de lipídios, a porcentagem de proteínas em massa seca, de carboidrato e lipídios.

Tabela 4- Porcentagem de Proteínas, Carboidratos e Lipideos em massa seca de microalgas.

Espécie	Proteína (%massa seco)	Carboidrato (%massa seco)	Lipídeo (%massa seco)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas rheinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	18
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-6	6-7
<i>Scenedesmus sp.</i>	21	15	21-43

Fonte: Adaptado de Colgo (2017)

4.4 *Scenedesmus sp.*

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

Geralmente são seres unicelulares, se agrupam em colônias com propagação estritamente assexuada por auto esporulação, formadas em geral com 2, 4, 8 ou até 16 células como apresentado na (Figura 1) que produzem um número geneticamente fixo de células, conhecido como cenóbio, e também são seres clorofilados (Lourenço, 2006).

A *Scenedesmus* é uma alga que comumente forma cenóbios com duas, quatro e oito células, mas também é encontrada como única célula. A morfologia pode variar consideravelmente pela alteração do meio de cultura onde estão crescendo (EGAN & TRAINOR, 1989). Em meio com pouco fósforo ou sais minerais, este gênero é induzido a crescer como única célula, semelhante aos gêneros *Chodatella* e *Franceia*, e quando privado de nitrogênio, podem ocasionalmente formar zoosporos (TRAINOR, 1992).

As microalgas do gênero *Scenedesmus* são espécies de rápido e fácil crescimento. A reprodução é realizada por isolamento das células individuais seguida por divisão celular (SEBASTIEN & GRANJA, 2005) afirmaram que esta espécie é “sem dúvida, o mais comum e cosmopolita dos gêneros de algas verdes”.

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).

Figura 2 – Morfologia microscópica da Microalga do gênero *Scenedesmus* sp.



Autores: (UNPAPROM et al., 2014.)

MUSHARRAF et al. (2012) analisaram o perfil de ácidos graxos de algumas espécies de microalgas: *Scenedesmus*, *Nannochloropsis* sp., *Anabaena* sp., e *Oscillatoria* sp. Dentre estas, *Scenedesmus* sp. demonstrou ser a mais promissora em termos de produção de óleo, atingindo um teor de 17% de óleo considerado adequado para a produção de biodiesel

4.5 *Chlorella* sp.

A microalga *Chlorella* sp. vem sendo cultivada desde 1960 no Japão, sendo que, em 1980, já existiam aproximadamente 26 fábricas de grande escala na Ásia, produzindo cerca de 1000 kg de biomassa por mês (SPOLAORE et al., 2006). Ela foi a primeira espécie a ser cultivada em grande escala, em 1961, no Japão pela empresa Nihon Chlorella, para ser comercializada como suplemento alimentar

(LOURENÇO, 2006). Sendo amplamente usada para cadeia alimentar artificial fitoplancton – zooplancton – peixe, devido a sua composição de ácidos graxos, que é importantíssima para o sucesso da aquicultura (PETKOV; GARCIA, 2007).

Muitas pesquisas em relação às propriedades nutricionais e até mesmo medicinais das *Chlorella sp.* estão sendo feitas: Gouveia et al. (2007) utilizaram a microalga para dar coloração esverdeada a biscoitos amanteigados, já Lee et al (2010) utilizou suplementação alimentar de *Chlorella sp.* em homens fumantes no combate a radicais livres oriundos do hábito de fumar e recomendam a utilização para uma dieta saudável, além de outras pesquisas envolvendo doenças ligadas à idade, tanto em animais quanto em humanos (OKAMOTO et al., 1978; TSUCHIDA et al., 2003).

A microalga *Chlorella sp.* possui 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais. ela contém ainda mais de 2% de clorofila, e 8% não identificado, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (HENRARD 2009).

Chlorella também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B12, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que juntamente com o ferro fazem desta microalga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia. Assim como a microalga Spirulina, a *Chlorella* possui o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration), podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. (HENRARD 2009).

Atualmente, a *Chlorella sp.* também tem sido muito utilizada para pesquisas em biodiesel, isso devido a sua satisfatória produção de lipídios (RASOULAMINI et al., 2011).

Sob certas condições a espécie pode armazenar em suas células uma grande quantidade de amido e óleo o que permite que seu crescimento seja mais rápido, outro fator de ampla importância é a grande quantidade de clorofila em suas células o que garante um bom desenvolvimento em produtos de alto valor agregado (VIEIRA, 2013).

Uma das principais características da *Chlorella sp.* é a sua capacidade de se adaptar às condições do cultivo, podendo crescer autotrófica, heterotrófica e mixotróficamente, conforme **Figura 3** (XU; MIAO; WU, 2006).

Figura 3 – Microalga do gênero *Chlorella* sp.



Microalga Chlorella vulgaris. Reproduzido de *Chlorella vulgaris* (2013).

4.6 Condições Nutricionais

Para o crescimento das microalgas é necessário que o meio de cultivo forneça os nutrientes necessários. Os elementos mais importantes que constituem as células das algas são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Outros elementos essenciais incluem ferro, magnésio, elementos traços e, em alguns casos, silício (Rebollos-Fuentes *et al.*, 2001).

Alguns autores apontam que a composição do meio de cultivo pode influenciar de forma direta a produção de lipídeos e as concentrações de diferentes ácidos graxos em microalgas. Freqüentemente, o aumento no acúmulo de ácidos graxos é descrito como consequência aos efeitos da limitação de nutrientes e do tempo de cultivo (JI *et al.*; 2014; CHELLAMBOLI & PERUMALSAMY *et al.*, 2014; MATA *et al.*, 2010).

Em condições onde o crescimento é limitado, verifica-se uma queda na divisão celular, na taxa fotossintética e na síntese de proteínas. A energia fotossintética é desviada da divisão celular para o acúmulo de carboidratos e síntese de lipídeos, ocorrendo também um aumento da síntese de enzimas específicas para a absorção de nutrientes (HU *et al.*, 2008; YEH & CHENG, 2012).

Na composição da biomassa microalgácea, além do carbono (C), estão presentes pelo menos 19 elementos químicos. Alguns são necessários em concentrações na ordem de miligramas por litro, como H, N, O, P, S, K, Na, Ca e Mg. Outros podem ser detectados como elementos traços ou micronutrientes e normalmente são requeridos em concentrações de nanogramas a microgramas por litro, como Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, B e V. Esses micronutrientes são incorporados em moléculas orgânicas essenciais, como

em uma variedade de coenzimas (CoA, cobamamida e etc) que participam de reações primordiais à vida da célula (REYNOLDS, 2006).

Normalmente, a única fonte de carbono utilizada no cultivo de microalgas é o CO₂ proveniente da atmosfera ou de gases de combustão. Já as fontes mais comuns de nitrogênio são nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺) e uréia ou combinações desses. Vale a pena mencionar que o amônio é a forma química do nitrogênio mais facilmente assimilada pelo fitoplâncton. Ao contrário do nitrato, não requer redução, sendo assimilado como aminoácidos. Entretanto, o amônio em alta concentração tem efeitos tóxicos sobre o crescimento das microalgas. Além disso, o amônio pode ir para a atmosfera, causando problemas ambientais e econômicos. Portanto, a seleção de fontes de nitrogênio para o cultivo de microalgas deve ser baseada em dados experimentais (Abalde *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2008).

Em condições apropriadas, ainda que as quantidades e os elementos variem de acordo com a espécie cultivada os principais compostos que limitam o crescimento celular das microalgas são o carbono, nitrogênio, o fósforo e o ferro. (Fontoura; 2017)

Entre os principais elementos mencionados para o desenvolvimento das microalgas, Dias (2017) aponta o dióxido de carbono como contribuição fundamental para os processos fotossintéticos, mencionando também a importância das proporções de nitrogênio incorporadas ao cultivo, que irão contribuir para que a síntese proteica eleve o teor de proteínas presente na biomassa das microalgas.

Oliveira (2013) apresenta em seus estudos a importância da presença de fósforo incorporado ao meio nutricional das microalgas, assim como as concentrações de ferro, nutriente ativo na respiração celular e fotossíntese.

Os macronutrientes formam os constituintes estruturais das biomoléculas, da membrana citoplasmática e do meio intracelular, e ainda participam dos processos energéticos e de regulação metabólica. A sua ausência ou insuficiência pode causar danos afetando algumas funções vitais desses microrganismos (LOURENÇO, 2006).

Além dos macronutrientes temos os carboidratos que atuam como fonte de energia, os glicídios também atuam na formação estrutural dos seres vivos, presentes na membrana plasmática, participam do revestimento celular. É considerado um composto presente nas microalgas de alto valor agregado, devido a sua potencial aplicação terapêutica, nutricional, cosmética, têxtil, energética, entre outras (Borges, 2014).

Presentes na grande maioria dos processos biológicos, as proteínas, também sintetizadas a partir da união de moléculas menores, de aminoácidos, são as moléculas orgânicas em maior concentração

presentes nas células das microalgas, compreendendo aproximadamente 50% do seu peso, e podem variar significativamente entre as espécies (Santos, 2013).

Sendo assim os principais componentes da biomassa obtida a partir de microalgas são lipídios, proteínas e carboidratos. Os lipídios são os componentes mais desejáveis do ponto de vista energético. As células com maior teor de lipídios e teores menores de carboidratos e proteínas têm elevado poder calorífico e têm maiores rendimentos de óleo quando processados através, por exemplo, de liquefação de biomassa (Tornabene *et al.*, 1983; Yamaberi *et al.*, 1998; Illman *et al.*, 2000; Scragg *et al.*, 2002).

Lourenço, 2006 traz em seu estudo que enxofre, magnésio, ferro e outros elementos também são indispensáveis para o crescimento das microalgas. A maior parte do enxofre presente nas células ocorre como componente estrutural de proteínas, por meio dos dois ácidos aminados sulfurados: cisteína e metionina. O enxofre ocorre na água do mar principalmente como íons sulfato, sendo este muito abundante. Por isso, o enxofre nunca é fator limitante ao desenvolvimento de microalgas marinhas. Já o magnésio é essencial a algas por ser constituinte da molécula de clorofila, ocorrendo no núcleo da mesma. O magnésio também está associado a várias enzimas, sendo um ativador de suas atividades. No caso de deficiência, gera o processo designado *clorose*, no qual as células perdem seu conteúdo pigmentar.

Além dos elementos acima citado o ferro também é extremamente importante para as algas por participar de inúmeras funções, como: vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos; respiração, transporte respiratório de elétrons; fotossíntese, transporte fotossintético de elétrons; redução de nitrato e de nitrito; redução de sulfato; fixação de nitrogênio molecular e; além desses exemplos, é cofator de diversas enzimas (Lourenço, 2006; Roden e Zachara, 1996).

As diferentes espécies de microalgas respondem de forma particular às alterações nutricionais no ambiente externo. Porém, um padrão conservado é a capacidade de adaptação que esses organismos apresentam frente a variadas condições. (Hakalin, 2014)

Por exemplo, um estudo realizado por AUBRIOT e colaboradores (2011) demonstrou que o fitoplâncton que crescia num lago com baixa disponibilidade de fosfato era capaz de adaptar-se aos pulsos periódicos deste nutriente, devido a liberação de fezes por animais aquáticos, e regular suas cinéticas de absorção de fósforo. Assim, o crescimento celular ocorre mesmo sem absorção simultânea de fosfatos, desde que estes sejam previamente acumulados na forma de corpos de polifosfatos (AUBRIOT *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2011).

BEN-AMOTZ (1995) reportou o cultivo comercial de *Dunaliella* sp. para a produção elevada de beta-caroteno em duas etapas: na primeira, utilizou-se fotobiorreatores com excesso de N e baixa salinidade

para otimizar a síntese de biomassa; e na segunda, reduziu-se a concentração de N e usou alta salinidade visando otimizar a produção de beta-caroteno.

Em estudos realizados com microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, PIORRECK e colaboradores (1984) observaram um aumento no conteúdo lipídico dessas microalgas sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos. Em culturas de *Chlorella*, nas quais a divisão celular cessou devido à falta de nitrogênio no meio de cultura, o conteúdo lipídico das células aumentou de 28 % para 70 %, coincidente com um decréscimo no conteúdo protéico de 30% para 8% (ROUND, 1973).

Além dos nutrientes também temos as vitaminas que são compostos orgânicos essenciais ao funcionamento do metabolismo e muitas podem ser encontradas como co-fatores de enzimas, desempenhando a função de coenzimas, que apresentam papéis vitais tanto para manutenção e crescimento quanto para acúmulos de biomoléculas na célula. Dentre elas, encontram-se a biotina, coenzima que catalisa reações de ativação de transferência de CO₂; a cobalamina (B12), coenzima que catalisa reações de isomerização e transferência de grupos metil; e tiamina (B1), coenzima que catalisa reações de ativação e transferência de aldeídos (ALBERTS et al., 2010).

Os principais elementos para o crescimento algal são: carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco, molibdênio e ferro (LOURENÇO, 2006).

PIORRECK e colaboradores realizaram um estudo 1984 com microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, PIORRECK e colaboradores (1984) observaram um aumento no conteúdo lipídico dessas microalgas sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos. Em culturas de *Chlorella*, nas quais a divisão celular cessou devido à falta de nitrogênio no meio de cultura, o conteúdo lipídico das células aumentou de 28 % para 70 %, coincidente com um decréscimo no conteúdo protéico de 30% para 8% (ROUND, 1973).

Entretanto como qualquer microrganismo, as microalgas alteram o seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultivo. Microalgas da mesma espécie podem possuir diferentes composições químicas, de acordo com o meio de cultivo utilizado (XIN et al., 2010).

Para o estudo em questão foram escolhidos os nutrientes ferro, zinco, nitrato, e a vitamina biotina:

Ferro (Fe): extremamente importante para as algas. Participa de funções como respiração, fotossíntese, da via biossintética da clorofila e do citocromo, reduz o sulfato, o nitrato e o nitrito, fixa o nitrogênio molecular e é cofator de diversas enzimas; (PEQUENO, 2010)

Zinco (Zn): assemelha-se aos papéis metabólicos do manganês. É componente estrutural da anidrase carbônica (transporte e fixação de CO₂), de enzimas envolvidas na transcrição do DNA e da fosfatase alcalina. Em meios de cultura, geralmente, deve ser adicionado na forma de sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O); (PEQUENO, 2010)

Vitaminas: apenas três vitaminas são efetivamente importantes para as microalgas: tiamina, biotina e cianocobalamina. Algumas espécies podem sintetizá-las, as que não sintetizam necessitam recebê-las de fontes exógenas. As demais vitaminas não atuam como fatores limitantes, pois: (a) são sintetizadas pelas algas, (b) são sintetizadas por microrganismos associados a algas e disponibilizados, (c) não apresentam funções biológicas para algas, (d) ou são necessárias em concentrações tão baixas ao ponto de serem irrelevantes (LOURENÇO, 2006).

Nitrogênio (N²): componente básico na formação de proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes, constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário e pode ser encontrado em concentrações variáveis no interior das células algáceas na forma inorgânica (nitrito, nitrato e amônio). É assimilado, preferencialmente, sob forma amoniacial (NH₃ e NH⁺), mas também podem ser assimiladas na forma de nitrogênio gasoso ou molecular (algumas cianobactérias), de nitrato (NO₃⁻), de nitrito (NO₂⁻). As principais fontes são os sais de nitrato, sais de amônio e uréia. As concentrações de proteínas e clorofilas nas células são diretamente proporcionais ao suprimento de nitrogênio, com isso, a diminuição da concentração de proteína, ocasiona aumento significativo no percentual de polissacarídeos e a diminuição da clorofila aumenta a concentração de carotenóides gerando mudança de coloração no cultivo que tendem ao aspecto amarelado; (PEQUENO, 2010)

Segundo PIORRECK et al. (1984), o nitrogênio é conhecido por ter uma forte influência no metabolismo de lipídios e ácidos graxos em várias algas. A deficiência de nitrogênio leva a uma acumulação de lipídios. Recentes estudos envolvendo várias algas revelam que o metabolismo de ácidos graxos e lipídios é influenciado pelo conteúdo de nitrogênio do meio. Foi observado que a baixos níveis de nitrogênio essas algas tem uma tendência a sintetizar lipídios neutros e ácidos graxos com um baixo grau de insaturação. Já em altos níveis de nitrogênio as algas sintetizam predominantemente lipídios polares como os monoglactosil diacilglicerol, diagalactosil diacilglicerol entre outros.

Em seus estudos, PIORRECK et al. (1984) constataram que a baixas concentrações de nitrogênio, todas as algas verdes contêm relativamente grandes quantidades de lipídios totais (44-66% do peso seco). Essas quantidades diminuem significativamente com o aumento da concentração de nitrogênio.

A fonte de nitrogênio, independente de qual seja, é incorporada como nitrogênio orgânico, na síntese de proteínas. Desta forma, a diminuição desta fonte acarretaria na diminuição da síntese de aminoácidos e, consequentemente, do teor protéico (REINEHR, 2003). COLLA et al., (2007) avaliaram a influência da concentração da fonte de nitrogênio no cultivo de Spirulina e verificaram que a concentração

inicial de nitrogênio não influenciou na concentração de lipídios e proteínas na biomassa. (PEQUENO 2010)

4.7 Nitrogênio

O nitrogênio pode estar presente no meio de cultivo de diversas maneiras, como na forma do íon nitrato (NO_3^-), amônia (NH_3) e íon amônio (NH_4^+). Para tal, solubilizam-se sais de nitrato (NaNO_3 , KNO_3) e de amônio (NH_4Cl), (NH_4), (SO_4) e uréia no meio de cultura (XIN et al., 2010).

O uso de qualquer um destes compostos como única fonte de nitrogênio pode acarretar mudança de pH durante o cultivo; quando o íon amônio (NH_4^+) é usada, o pH fica mais ácido devido à liberação de H^+ no meio; já o uso de NO_3^- deixa o pH mais elevado. Não há diferença significativa na produção de microalgas entre as duas fontes de nitrogênio (RICHMOND, 2004).

Como é um nutriente muito importante, muitas formulações de meio de cultivo são feitas com o propósito de não deixar o nitrogênio como agente limitante de crescimento. Condições nas quais o nitrogênio é escasso, a microalga tende a fazer reservas de energia, acumulando lipídeos (RICHMOND, 2004).

Outra característica de um cultivo com ausência de nitrogênio é a produção de carotenoides secundários, ao mesmo tempo em que diminui a quantidade de clorofila nas células. Tal característica é observada na espécie *Dunaliella*, cujo cultivo tende a ficar da cor amarela, pelo acúmulo de β -caroteno, na limitação do nutriente no meio de cultivo (LOURENÇO, 2006).

Gao et al. (2013) mostraram a influência da limitação ou ausência de nutrientes sobre duas espécies de microalgas, *Chaetoceros muelleri* e *Dunaliella salina*, analisando a performance fotossintética, composição da biomassa e produção de lipídios, mostrou que o maior conteúdo de lipídeos para a *C. muelleri* (46,32 %) ocorreu na ausência de nitrogênio; para a *D. salina* (54,15 %), a privação de todos os nutrientes fez com que atingisse esse percentual.

Harwati et al. (2012) também realizaram experimentos estudando a influência do nitrato no crescimento de biomassa e na produção de lipídeos da microalga *Chlorococcum* sp.. Foi verificado que, quando a concentração de nitrato é baixa, o acúmulo de lipídeos é alto e a concentração de biomassa cai, entretanto, o contrário acontece também.

4.8 Crescimento das Microalgas

O crescimento de microalgas para produção de biomassa pode ser classificado segundo diferentes parâmetros. Normalmente, a divisão pode ser feita com base nos métodos de crescimento, ou seja, a via metabólica que se induz para o crescimento, ou na tecnologia/ sistema de produção de biomassa adotado, isto é, o sistema que servirá de base para o crescimento das culturas. O crescimento de microalgas para produção de biomassa pode ser classificado segundo diferentes parâmetros. Normalmente, a divisão pode ser feita com base nos métodos de crescimento, ou seja, a via metabólica que se induz para o crescimento, ou na tecnologia/ sistema de produção de biomassa adotado, isto é, o sistema que servirá de base para o crescimento das culturas. (Silva, 2014)

É importante ressaltar as principais condições ou fatores que influenciam o crescimento das microalgas. A satisfação das necessidades metabólicas é obviamente o ponto fulcral, pelo que no caso mais habitual, de microalgas fotossintéticas. (Silva, 2014)

A luz é tida como o principal parâmetro a controlar na otimização do processo de crescimento, seguindo-se a temperatura, aeração, o pH e a presença de CO₂ e O₂ no meio (Behrens, 2005). A gama de temperaturas ideais é um fator que varia de espécie para espécie, pelo que apenas através do estudo científico é possível otimizar essa condição. Não é aconselhável testar o crescimento de algas para temperaturas superiores a 30 °C, visto tratarem-se de temperaturas demasiadas altas para a maioria das espécies e resultarem na inibição do seu crescimento (Suali and Sarbatly, 2012).

A composição celular das microalgas é ajustada conforme os processos metabólicos podendo ser classificadas como autotróficos durante a conversão de compostos inorgânicos e energia luminosa em carbono orgânico; heterotróficos, quando os nutrientes são favorecidos na ausência de luz e mixotróficos quando ambos os metabolismos ocorrem (Morais, 2011).

Assim sendo, um dos princípios básicos para a implementação de um processo de crescimento de microalgas é a identificação do método de cultura, isto é, selecionar qual é a via metabólica que se pretende que as culturas adotem. As microalgas podem crescer com base em 4 tipos de metabolismo (Gouveia, 2011):

- ✓ fotoautotrófico: usando a luz como única fonte de energia, transformando energia solar em energia química através da fotossíntese;
- ✓ heterotrófico: recorrendo exclusivamente a compostos orgânicos como fonte de carbono e energia;

- ✓ mixotrófico: ambas as formas de carbono, ou seja, orgânico e inorgânico (CO_2), são essenciais visto que o organismo é capaz de crescer autotroficamente e heterotroficamente, dependendo da concentração de compostos orgânicos e da intensidade luminosa disponível;
- ✓ fotoheterotrófico: no caso de necessitarem de luz para processar compostos orgânicos como fonte de carbono. Existe alguma confusão entre esta via e a mixotrofia, já que a diferença reside apenas na fonte de energia necessária para ocorrer crescimento e produção de metabolitos específicos.

A escolha pelo crescimento de microalgas e produção de biomassa segundo uma das vias metabólicas apresentadas obedece a um conjunto de critérios relacionados com a tecnologia que é requerida para implementação do método. Cada uma das vertentes metabólicas apresenta as suas vantagens e desvantagens. (Angelo; 2014)

A via fotoautotrófica pode ser explorada a partir de diferentes condições, sendo que a principal diferença é a divisão entre crescimento em lagoas ou em reatores fechados, habitualmente designados por fotobioreatores. As principais necessidades neste tipo de método é a climatização do meio, captação de água, CO_2 e outros nutrientes, terreno e energia para operação do sistema. Quanto ao crescimento heterotrófico baseia-se, normalmente, na produção de biomassa com recurso a um fermentador convencional. Neste caso, os requisitos para a operação envolvem uma fonte de carbono orgânico adequada e sustentável do ponto de vista econômico e ambiental. (Angelo, 2014)

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

De acordo com Chen *et al.*, (2015) diferentes tipos de fotobioreatores tem sido desenvolvidos para o cultivo de microalgas, os mesmos podem ser descritos em formato de painel, tubulares, montado na vertical ou horizontal, transparentes feitos de vidro, acrílico ou plástico, apresentando vantagens e limitações específicas para cada espécie a cultivada.

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

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

Já o sistema aberto ou Sistema “outdoor” (ao ar livre), a principal fonte de luz é a solar, utilizadas desde a década de cinquenta, a produção em tanques abertos representam características próximas ao habitat natural de cultivo das microalgas, o sistema é dotado de variados formatos, podendo ser classificado em águas naturais (lagoas, lagos e açudes) e águas artificiais (tanques e containers) (Tomas, 2016).

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

A **Tabela 5** traz as vantagens e desvantagens de cada tecnologia utilizada para o crescimento das microalgas.

Tabela 5- vantagens e desvantagens de cada tecnologia utilizada para o crescimento das microalgas.

Método	Tecnologia	Vantagens	Desvantagens
Fotoautotrófico	Fotobiorreatores fechado	<ul style="list-style-type: none"> Menores perdas de água Tempo de retenção da cultura superior Capacidade para suportar densidades celulares elevadas 	<ul style="list-style-type: none"> Implementação a escala comercial Regulação da temperatura Limpeza periódica Necessidade máxima de exposição luminosa
Fotoautotrófico	Lagoas abertas	<ul style="list-style-type: none"> Arrefecimento espontâneo por evaporação Capital para investimento inicial inferior 	<ul style="list-style-type: none"> Alterações diárias e sazonais da temperatura e umidade Contaminações Necessidade máxima de exposição luminosa
Heterotrófico	Fermentadores	<ul style="list-style-type: none"> Facilidade no controle das condições ótimas para produção Prevenção de contaminação Obtenção de concentrações de biomassa superiores 	<ul style="list-style-type: none"> Custo e disponibilidade de matéria prima Competição pela matéria prima com outras tecnologias para produção de combustíveis

Fonte: (Adaptado de (Ferell et al., 2010)

Além dos nutrientes a algumas condições de cultivo que afetam o crescimento e a produção de lipídeos das microalgas, segundo Fontoura (2017) é necessário que ocorra um equilíbrio entre os fatores físicos, químicos e biológicos, tais como a temperatura, iluminação, aeração, pH, concentração de inóculo e dias de cultivo. Essas variáveis influenciam diretamente no crescimento e produção lipídica da biomassa algal.

4.8 Aeração

Se tratando de um sistema de cultivo de microalgas fechado, a aeração é um processo fundamental para homogeneizar o meio de cultivo com as microalgas, auxiliando no controle de temperatura, incidência luminosa, transferência de gases além de controlar a atividade fotossintética (CARTAS, 2018).

A aeração vai aumentar as trocas gasosas entre o ar e a cultura além de auxiliar na estabilidade do pH através do sistema carbonato-pH,. Ela também serve para homogeneizar os nutrientes e células no meio, permitindo que todas as células recebam luz na mesma proporção. Também evita que as algas se sedimentem ou se agrupem nas paredes, afetando a recepção de luz, o que pode levar à morte das células. A aeração pode ser fornecida por um compressor de pistão seco ou a óleo, ou por um soprador de ar radial (GOMES, 1986; BORGHETTI, 2009; FRANCO *et al.*, 2013).

4.9 pH – Potencial Hidrogeniônico

Determinar a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio, o que tem influenciado direta ou indireta no metabolismo das microalgas são um dos parâmetros mais importantes no processo de cultivo de microalgas (ARCEO, 2012; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

Vários fatores podem influenciar as alterações no valor de pH, como composição e capacidade de transporte do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade de CO₂) e atividade metabólica das células. Por outro lado, isso vai depender da espécie de microalga estudada pois cada espécie de microalga possui uma faixa de pH adequada para seu crescimento. Porém a grande maioria das espécies de microalgas crescem em pH neutro a alcalino (ARCEO, 2012; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

4.9.1 Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos, por isso a temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes no estudo e da finalidade dos cultivos. De acordo com o autor Oshe et al, (2008) a temperatura ótima para o crescimento de microalgas é em torno de 20°C a 35°C e que com as condições específicas de nutrientes e luz elas podem ter uma taxa ótima de crescimento.

Assim o crescimento das algas pode ser acelerado com o aumento da temperatura até atingir um nível de saturação e morte das células (GOMES, 1986; MORAES, 2011; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

4.9.2 Iluminação

Para contornar as limitações da luz natural, pode-se recorrer à iluminação artificial. A maioria das espécies suporta iluminação contínua e, para melhor rendimento, este procedimento tem sido normalmente empregado. A luz artificial possibilita produção diária contínua, pois assume o papel da radiação solar durante a noite ou complementa-a conforme as variações se instalam (GOMES;1986; ARCEO, 2012).

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*

As cepas das microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmuss sp* foram isoladas e mantidas no LEMARC, Laboratório de Energias Renováveis, Materiais e Catálise, no instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (Química) - UFU - Universidade Federal de Uberlândia. Toda a manutenção, e testes experimentais das cepas foram realizados em condições controladas, que são apresentados nos itens abaixo, além de passarem por um severo processo de lavagem, utilizando álcool e água destilada. Após a esterilização dos recipientes, iniciou-se o cultivo com as ambas as espécies.

5.1.1 Meio de Cultura

As microalgas precisam de um meio suplementado para que cresçam, portanto para o cultivo e manutenção, foi utilizado o meio sintético Chu (Tabela 6). A procura de uma melhor condição de produção para as amostras de biomassa algal, foi feito a preparação deste meio sob quatro condições diferentes: 150% de nitrato, 30% de Nitrato, 150% de Ferro, e 200% de Ferro em relação ao meio Chu. Preparou-se a respectiva soluções, com as concentrações (g/L) de cada reagente utilizado para cada litro de meio. (SILVA 2014)

Tabela 6 - Meio de Cultivo Chu

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

Fonte: Adaptado de Silva (2014)

As diferentes concentrações de Nitrato e ferro foram adotadas objetivando verificar em qual destas o crescimento das microalgas *Chlorella sp.* e *scenedesmus sp.* teria melhor resultado, em termos crescimento de biomassa mas principalmente em porcentagem de lipídios.

Foi necessário o preparo de quatro soluções estoque, pesou-se separadamente cada reagente, transferiu-se os reagentes para balões volumétricos de 1 L e, por fim, aferiu-se com água destilada. As soluções foram armazenadas em frascos âmbaras mantidos na sala de cultivo por até 1 ano em temperatura ambiente próxima a 25°C.

5.1.2 Condições de cultivo

O cultivo ocorreu em reatores horizontais, do tipo bandeja aberta em acrílico com volume útil de 1 Litro, fechados com plástico filme de PVC com perfurações aleatórias para auxiliar na oxigenação e minimizar a evaporação, mantidos em temperatura ambiente próxima a 25°C, com controlador de fotoperíodo em 12 horas de luz e 12 horas de escuro, utilizando 3 lâmpadas fluorescentes brancas de 40 Volts por 30 dias (**Figura 4**), semelhante à unidade experimental adotada por Ramirez (2013).

Figura 4- Condições laboratoriais de cultivo das microalgas.



Fonte: próprio autor

Leitura de crescimento celular e biomassa seca

As leituras de densidade ótica foram realizadas a cada 7 dias em triplicata de cada alíquota de cultivo no comprimento de onda de 570 nm, com auxílio do espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-1800 conforme a **Figura 5**.

Figura 5- Espectrofômetro Shimadzu, UV-1800 , usado para medição de crescimento celular.



Fonte: Próprio autor

Foram realizadas as análises de massa seca e densidade celular para determinar a quantidade de biomassa produzida. A relação entre a absorbância e a porcentagem de massa seca possibilitou a construção da curva analítica para determinação do teor de lipídios nos experimentos do planejamento experimental.

Para colheita de biomassa e determinação de sua massa seca (g) a quantidade total de cada reator foi submetido ao processo de centrifugação, em um equipamento da marca AAKER, em uma rotação de 4000 rpm por 5 minutos, em seguida o sobrenadante composto pelo meio de cultivo foi descartado, para que assim o sedimento de biomassa fosse reservado em bêquer previamente pesado, levado para secagem em estufa a 80°C por 48 horas (Figura 6). Para realizar a quantificação de biomassa seca final expressas em g/L, as amostras foram pesadas de acordo com a metodologia indicada por Ramirez (2013).

Figura 6 – Estufa utilizada para secagem de biomassa das microalga.



Fonte: próprio autor

As espécies de microalgas escolhidas, e os nutrientes adicionados ao meio, são variáveis importantes para o crescimento das algas e obtenção dos lipídios a fim de produzir biodiesel.

Neste sentido planejou-se os experimentos a fim de maximizar a produção de lipídios em quantidade significativa. Para o experimento utilizou-se o planejamento fatorial 2^3 , a **Tabela 7** traz cada um dos fatores analisados no cultivo.

Tabela 7- Variáveis e níveis estudados para a otimização do processo de produção frente ao cultivo de microalgas.

	Variável	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
E.M	Espécie de Microalga	<i>Scenedesmus sp</i>	<i>Chlorella sp</i>
N	Nitrato	0,375g/L	0,075g/L
F	Ferro	0,0075g/L	0,01g/L

Fonte: Próprio autor

A partir das variáveis selecionadas e seus níveis, foi construída a matriz do planejamento fatorial 2^3 , apresentando a combinação de todas as condições experimentais para o cultivo das algas. A **Tabela 8** apresenta a matriz do planejamento de experimentos, realizados pra tornar o processo de cultivo das algas mais viável.

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

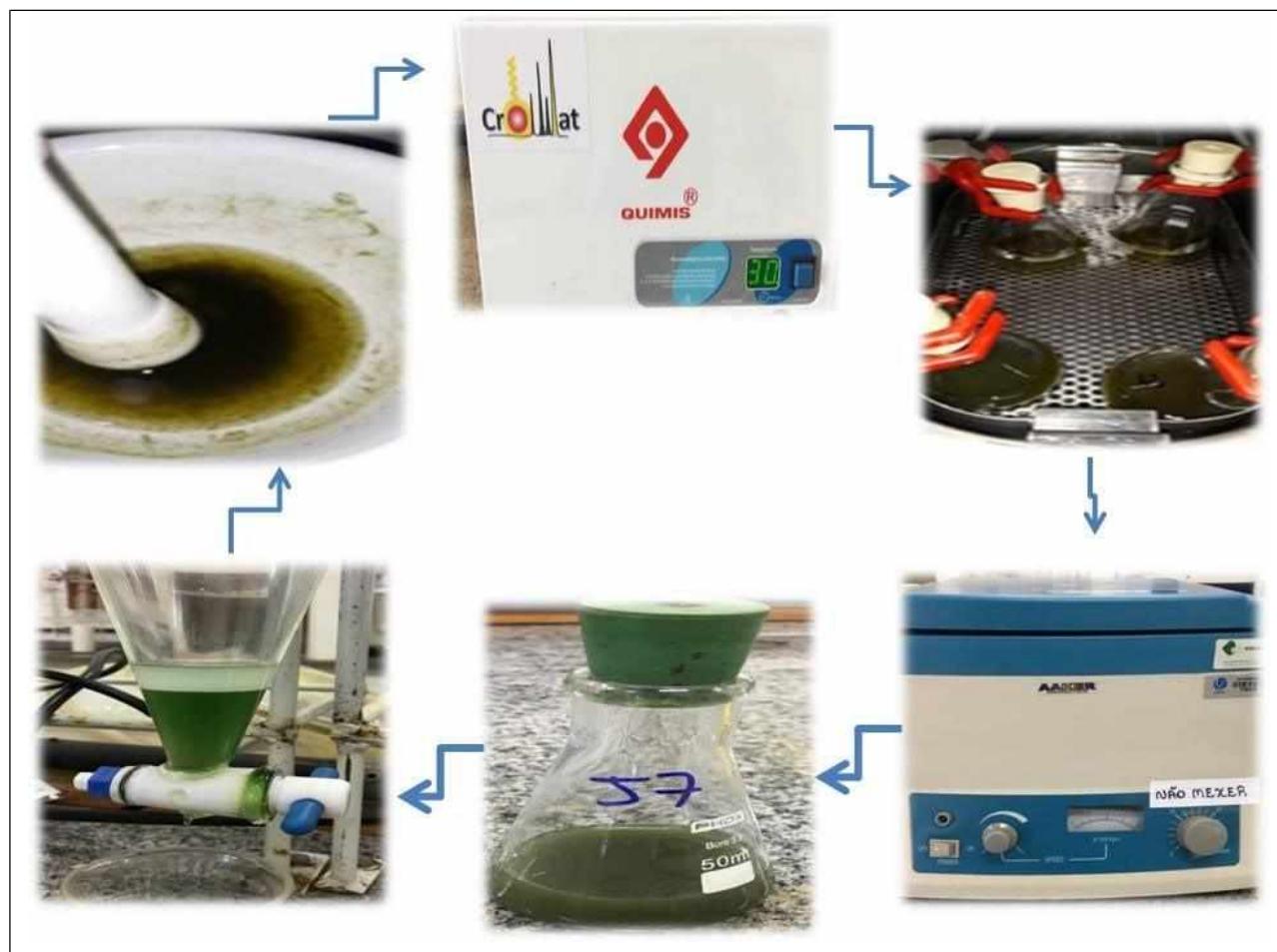
Ensaio	Variáveis		
	E.M	N	F
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: Próprio autor

Extração de Lipídeos segundo Folch Less e Sloane Stanley

Após a colheita de biomassa seguida de centrifugação e secagem, a amostra de aproximadamente 1000 mg foi submetida a extração de lipídeos conforme metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957), inicialmente a massa seca foi macerada em cadrinho de porcelana com adição de 20 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol, em seguida, a mistura foi transferida para erlenmeyer de 125 mL e submetida à 3 ciclos de sonificação de 30 minutos cada, em banho ultrassom (QUIMIS - Ultrasonic Cleanner 1400, frequência de 40 kHz), para auxiliar na ruptura celular, após esse processo a amostra foi encaminhada para centrífuga (**Figura 7**).

Figura 7 – Esquema de extração de óleo das microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* utilizando, cadrinho, banho ultrassônico e centrífuga, seguindo para funil de separação.



Fonte: Próprio autor

Ao final dos ciclos em que a amostra foi centrifugada por 8 minutos, a parte sólida sedimentou-se e o sobrenadante contendo os lipídeos foi extraído e transferido para um bêquer de 200 mL, com solução de 12 mL de KCl e submetido a agitação e encaminhados para o funil de separação, após formação de duas fases, reservou a fase contendo os lipídeos adicionando 4 mL de mistura metanol/água 1:1, o funil com a mistura foi submetido a nova agitação. A fase superior foi retirada por succão com auxílio de pipeta graduada e descartada, e a fase inferior contendo lipídios foi recuperada e encaminhada para secagem com sulfato de magnésio, e transferida para um balão volumétrico submetido a uma capela de exaustão para completa evaporação dos solventes.

Posteriormente a massa dos frascos contendo óleo produzido em cultivo onde cada reator possui volume útil de 1 litro, foi aferida para que o cálculo gravimétrico fosse realizado obtendo a medida do teor lipídico total em porcentagem de acordo com a equação:

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

Sendo:

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

Otimização das condições de cultivo.

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

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

O PCC foi realizado com duas variáveis, resultando em 11 experimentos entre os níveis dos fatores de interesse, composto por 4 pontos cúbicos (+1 e -1), 4 pontos axiais (+ α e - α) e 3 repetições no ponto central. As

variáveis analisadas foram a concentração de zinco do meio Chu (%) e a inserção de biotina em diferentes concentrações. A variável resposta dos planejamentos foi o teor de lipídeos determinado pelo método de extração de Folch; Lees e Stanley (1956).

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

Tabela 9- Variáveis e níveis da otimização do teor lipídico

Variável	Nível				
	-1,41	-	0	+	1,4
(1) Zinco	0,3g	0,5g	1,0g	1,5g	1,7g
(2) Biotina	0,075g	0,125g	0,25g	0,375g	0,425g

Fonte: Próprio autor

Tabela 10 - Matriz de planejamento composto central em 2 variáveis para otimização do teor lipídico (1- Concentração de zinco no meio Chu em porcentagem (%)) e 2 – inserção de biotina em diferentes concentrações.

Ensaios	Valor codificado A	Valor codificado B	ZINCO	BIOTINA
1	-	-	0,5	0,125
2	+	-	1,5	0,125
3	-	+	0,5	0,375
4	+	+	1,5	0,375
5	0	0	1,0	0,25
6	0	0	1,0	0,25
7	0	0	1,0	0,25
8	- 1,4	0	0,3	0,25
9	+ 1,4	0	1,7	0,25
10	0	-	1,0	0,075
11	0	+1,4	1,0	0,425

Fonte: Próprio autor

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

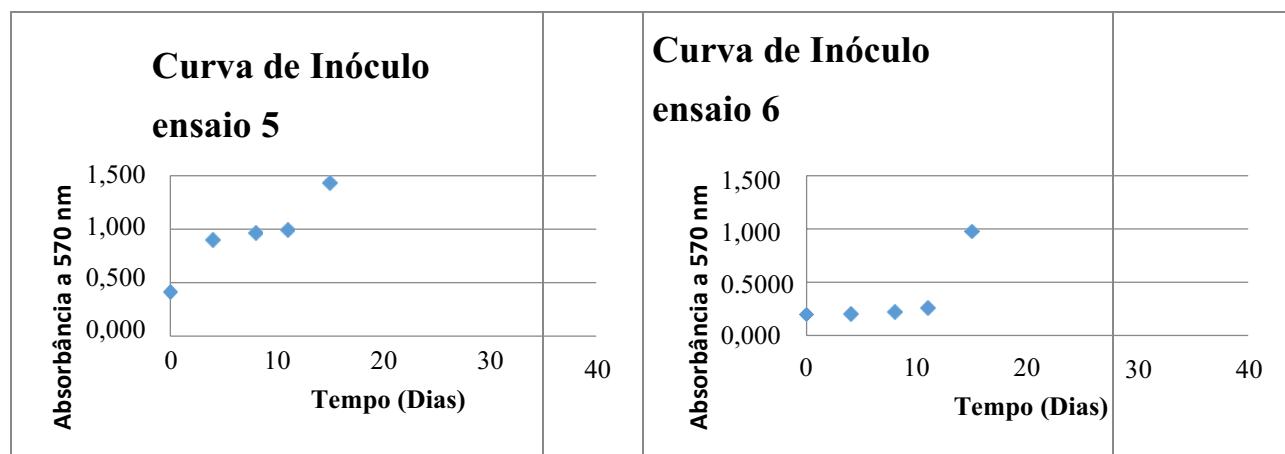
Avaliação de crescimento das microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*

Os processos metabólicos influenciam diretamente no crescimento das microalgas, considerando a possível ocorrência de alterações nas propriedades químicas e características morfológicas desses organismos. Sendo assim é essencial avaliar o crescimento das espécies acompanhando seu desenvolvimento através de análises de densidade óptica em espectroscopia eletrônica. (Ramirez, 2013).

Por apresentar um rápido ciclo de vida, as microalgas saem na frente de outras matérias primas. Tendo a frente essa vantagem se faz necessário testar métodos que viabilizem as análises de crescimento microalgal, para um maior conhecimento da velocidade de sua reprodução frente as variáveis impostas ao cultivo (Pereira Filho *et al.*, 2010).

O crescimento celular de todos os ensaios foram monitorados a cada sete dias por absorbância a 570 nm, analisando a densidade óptica. Nesse sentido foi possível verificar na **Figura 8**, o perfil de crescimento das algas (Absorbância)

Figura 8 – Analise de Crescimento celular.



Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que a densidade celular das microalgas apresentaram uma fase de crescimento gradativo em todos os experimentais, porém podemos notar que o percentual de desenvolvimento é ainda maior entre 15 e 20 dias de cultivo, observando os ensaios 5 e 6, que foram submetidos as mesmas condições

de cultivo, podemos notar esse percentual de desenvolvimento, lembrando que todos os ensaios foram condicionados ao cultivo de 30 dias, e em média todos apresentaram esse resultado. Nesse contexto através da análise de crescimento celular podemos observar que 20 dias será o tempo mais indicado para dar continuidade ao experimento, pois após esse período poderia iniciar um decréscimo celular, devido o alto consumo de nutrientes pelas algas.

RAMIREZ (2013) em seu estudo verificou que em um período de 16 dias, condicionou uma produção de biomassa de 1,94 g/L, em que observou-se que a microalga *Scenedesmus sp.* após a fase de crescimento linear (dias 10-25) pode ocorrer um decaimento na densidade celular.

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

Avaliação do teor lipídico das variáveis selecionadas

A biomassa produzida pelos meios de cultivo, foi submetida a centrifugação e secagem para extração de óleo conforme metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957). Posteriormente a massa dos frascos contendo óleo produzido foi aferida para que o cálculo gravimétrico, obtendo ao final do processo metodológico a medida do teor lipídico total em porcentagem.

A metodologia de cultivo estudada, teve como intuito avaliar se as variáveis selecionadas possuem influência na formação lipídica das microalgas. Recordando que as três variáveis escolhidas foram: espécies de microalgas, concentração de nitrato, e concentração de ferro, empregando dois níveis para cada variável.

A **Tabela 10** apresenta a matriz do planejamento e as interações entre as variáveis, para verificar a influência da variável sobre a resposta que está sendo medida, o teor de lipídeos.

Tabela 10 - Porcentagem de teor lipídico de acordo com o planejamento fatorial 2³

Ensai o	Variável							% T.L
	E	N	F	ExN	ExF	NxF	ExNxF	
1	-	-	-	+	+	+	-	7,04
2	+	-	-	-	-	+	+	15,04
3	-	+	-	-	+	-	+	9,34
4	+	+	-	+	-	-	-	13,41
5	-	-	+	+	-	-	+	9,50
6	+	-	+	-	+	-	-	5,08
7	-	+	+	-	-	+	-	4,82
8	+	+	+	+	+	+	+	20,19

Fonte: Próprio autor.

Para a variável ferro quando analisamos os ensaios 1 e 5, onde ambos foram condicionados a mesma espécie de microalga com a mesma concentração de nitrato, alterando apenas a concentração de ferro, pode-se observar que o ensaio 5 obteve maior porcentagem em teor lipídico, onde o mesmo possui maior quantidade de ferro.

O mesmo resultado foi apresentado quando observamos ainda os ensaios 4 e 8, onde ambos foram submetidos a mesma espécie de microalga, sendo ela *chlorella* sp. com 30 % de nitrato, alternando somente a concentração de ferro, obtendo assim a maior porcentagem em teor lipídico no ensaio 8, onde o mesmo foi submetido a maior concentração de ferro.

Através dos resultados de teor de lipídicos, calculou-se os efeitos das variáveis em cada ensaio. Os efeitos foram calculados através de média aritmética da porcentagem de lipídios para cada variável e em cada nível, aplicando o resultado na equação 6.1 abaixo:

O cálculo adotado para efeito é:

Cálculo de efeito obtido conforme Equação 6.1:

$$E_f = \overline{\%T_{(+)}} - \overline{\%T_{(-)}}$$

O teor de lipídios obtido para o experimento realizado em um nível (+) de uma dada variável, enquanto % TL (-) é o teor de lipídios obtido para o experimento realizado em um nível (-) de uma dada variável, a equação foi aplicada para cada variável estudada. A Tabela 11 traz os seguintes valores de efeito:

Tabela 11- Efeitos das variáveis estudadas e suas interações

Variáveis		Efeitos
1	Espécies de microalga	+ 6,03
2	Nitrato	+ 2,51
3	Ferro	-1,22
12	Espécies x Nitrato	+3,69
13	Espécie x Ferro	-0,19
23	Nitrato x Ferro	+2,35
123	Espécie x Nitrato x Ferro	+5,84

Fonte: Próprio autor

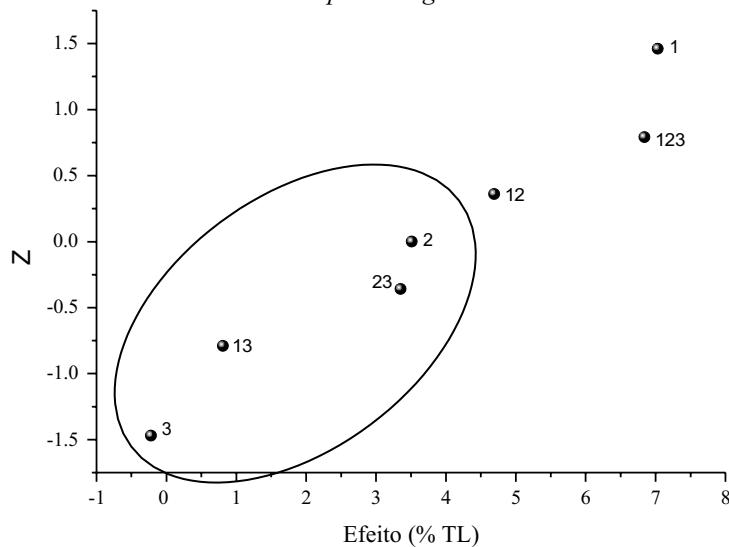
De acordo com os valores de efeito, as espécies de microalgas apresentaram maior importância para o cultivo. O valor de efeito +2,51 indica que quando se aumenta a concentração de nitrato de 30% para 150% o teor de lipídeo aumenta 2,51 g/L, Sendo assim quanto maior teor lipídico maior interesse para produção de biodiesel. De acordo com o efeito os valores de efeitos negativos, apresentaram menor significância no teor lipídico.

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

Para construir o gráfico normal de efeitos foi realizado o cálculo das interações entre os fatores, resultando no total de sete efeitos: três efeitos principais, três interações de dois fatores e uma interação de três fatores. Para o cálculo dos efeitos de interação de variáveis multiplicamos os sinais dos níveis de elemento a elemento. Primeiro, as interações das variáveis são determinadas pela multiplicação dos níveis de duas a duas, depois de três a três variáveis (Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

A significância dos efeitos pode ser melhor observada através do gráfico normal dos efeitos, Figura 8.

Figura 8 - Gráfico normal de efeitos para o cultivo das algas. Sendo que 1 corresponde ao meio de cultivo, 2 ao tempo de cultivo e 3 à porcentagem de inóculo.



Os valores de efeitos mais dispersos de zero são estatisticamente significativos, e aqueles que se aproximam deste valor possuem menor influência na resposta, ou seja as variáveis 3,13, 23 e 2, teve pouco influência no teor de lipídeos, e os efeitos mais significativos para a resposta são os efeitos 12, 123 e 1. Mas como valores compostos tem menor influência que uma variável pura, podemos dizer que o efeito 1 (Espécie de microalga) é o que teve maior influência sobre os resultados encontrados (% TL).

Analizando os gráficos anteriores, podemos então observar que dentro da variável espécie, a que obteve maior porcentagem em produção de lipídios foi a espécie *Chlorella sp.* mostrando assim que a espécie *Chlorella sp.*, foi a que obteve mais adaptação ao meio inserida, e consequentemente maior produção em teor lipídico.

6.3 Biomassa seca e teor lipídico produzido

A Tabela 12 nos mostra os resultados obtidos através de um conjunto de variáveis onde analisou-se o crescimento das microalgas utilizando duas espécies distintas de microalgas (*Chlorella sp.* e *Scenedesmus*

sp.), duas concentrações de nitrato (30% e 150%), e duas concentrações de Ferro (150% e 200%) analisados em ensaios distintos, aleatórios de acordo com plano fatorial.

Tabela 12 - Biomassa seca e quantidade de óleo produzido por reator e teor Lipídico.

	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor Lipídico (%)
Ensaio 1	0,9714	0,0684	7,04
Ensaio 2	0,53772	0,0828	15,4
Ensaio 3	0,8918	0,0833	9,34
Ensaio 4	0,9802	0,1315	13,41
Ensaio 5	1,4233	0,1353	9,50
Ensaio 6	1,8427	0,1076	5,8
Ensaio 7	0,7061	0,0341	4,82
Ensaio 8	2,3628	0,4771	20,19

Fonte: Próprio autor

O cultivo de microalgas em diferentes condições de cultivo usualmente apresenta respostas variadas devida as distintas composições, principalmente quando se trata de concentrações de nitrato e ferro (RUANGSOMBOON, 2012).

Em média os melhores resultados, em termos de produção de óleo, foi observado na variável espécie de microalga *Chlorella sp*, além disso o teor de lipídios máximo foi verificado no ensaio 8, quando se cultivou *Chlorella sp.* em meio sintético Chu com depleção de 30% de nitrato.

Singh et al, 2014, explica em sua literatura que o nitrato é um nutriente importante para o crescimento das microalgas, e na sua deficiência o ciclo é interrompido, e é durante essa condição de estresse biológico que as células de microalgas direcionam seu metabolismo para a síntese de lipídios, o que poderia explicar os maiores valores encontrados na variável nitrato quando submetida a uma diminuição de 30% .

Silva 2016 em seu estudo também observou que na condição de depleção de nitrato ocorreu um menor crescimento celular, porém uma maior concentração de lipídios de interesse para biodiesel, e com

maior concentração de ferro o crescimento celular foi aumentado e apresentou-se como a segunda melhor condição para a produção de ácido oléico, e ácido palmítico.

Por outro lado, quando analisado a variável espécie de microalgas *Scenedesmus sp*, pode-se observar que os resultados dos ensaios com depleção de nitrato, obtiveram o mais baixo percentual de teor lipídico, em contra partida o melhor resultado observado para a variável da espécie *Scenedesmus sp*, foi nos ensaios onde houve aumento de nitrato, como mostrado nos ensaios 1 e 8. Com isso foi possível concluir que a espécie *Scenedesmus sp* não se adaptou a condição de depleção desse nutriente.

Assim como, CHAICHALERM ET AL, (2012) também cultivou *Scenedesmus sp*. com aumento de nitrato de 1,5g/L em seu meio BG11N, e observou um aumento de acúmulo lipídico de 2,6 vezes maior do que nos outros meios testados.

Otimização das condições de cultivo

A partir dos resultados obtidos, será dada a continuidade da pesquisa de otimização do meio de cultivo, com a utilização apenas da espécie de microalga *Chlorella sp*. com depleção de nitrato para 30% de acordo com os valores definidos pelo meio sintético Chu, com tempo de cultivo de 20 dias, gerando assim maior produção de teor lipídico extraído das microalgas.

Para a próxima etapa, será avaliado as seguintes variáveis: concentração de zinco no meio Chu (%) e concentrações diferentes de biotina, conforme disposto na Tabela 13, foram realizados experimentos fundamentados em um planejamento estatístico do tipo planejamento composto central (PCCR).

*Tabela 13– Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e teor lipídico das microalgas *Chlorella sp*. em processo de otimização de cultivo.*

	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor Lipídico (%)
Ensaio 1	0,9710	0,0781	8,04%
Ensaio 2	0,4211	0,0226	6,14%
Ensaio 3	0,3581	0,1527	42,64%
Ensaio 4	0,9987	0,1346	13,47%
Ensaio 5	2,4621	0,4617	18,75%
Ensaio 6	1,0602	0,0956	14,93%
Ensaio 7	0,8131	0,1121	13,78%
Ensaio 8	0,8215	0,3214	39,12%
Ensaio 9	0,0831	0,0031	3,73%
Ensaio 10	1,8318	0,1125	5,36%
Ensaio 11	1,2652	0,6521	51,54%

* quantidade produzida por reator com capacidade de 1 litro.

A partir do modelo estatístico, foi obtido como respostas o teor de lipídeos, expresso em %, a quantidade de óleo produzidos, em gramas e biomassa seca (g/L). Todos os ensaios experimentais foram realizados em duplicatas, com tempo de 20 dias, e os resultados apresentados são a média dos valores obtidos.

Modelo estatístico:

$$\hat{y} = 15,82 - 10,14x_1 + 13,40x_2 + 0,96x^2 + 4,47x^2 - 6,82x_1x_2 \quad \text{Eq. 1}$$

$\pm 1,50 \quad \pm 0,92 \pm 0,92 \pm 1,09 \pm 1,09 \pm 1,30$

Em que: x_1 é o valor codificado para zinco e x_2 é o valor codificado para biotina

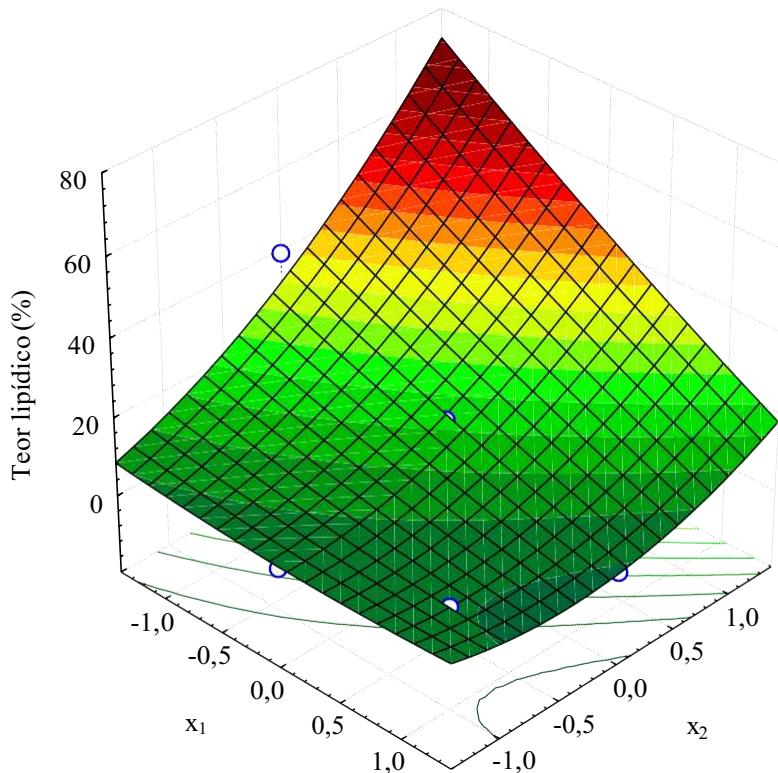
O ajuste do modelo foi avaliado pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na **Tabela 14**.

Tabela 14. Análise de variância para o modelo estatístico ajustado ao teor de lipídeos obtido na produção da alga Chlorella sp.

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	Nº G.L.	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	2.559,76	5	511,95	
RESÍDUOS	235,37	5	47,07	
FALTA DE AJUSTE	221,83	3	73,94	10,92
ERRO PURO	13,54	2	6,77	
TOTAL	2795,13	10		
% de variação explicável (R ²)	99,52			
% de variação explicada (R ² ajustado)	91,58			

De acordo com a ANOVA 99,52 % da variação ocorrida no experimento é explicável pelo modelo estatístico da Equação 1. Isso significa que o modelo está bem ajustado ao processo de obtenção do teor lipídico da microalga *Chlorella* sp. Além disso, o modelo não apresentou falta de ajuste pelo teste F, uma vez que a razão entre a MQ_{faj}/MQ_{ep} foi de 10,92, enquanto que o valor de $F_{crítico}$ foi de 19,16, ou seja, a $MQ_{faj}/MQ_{ep} < F_{3,2,95\%}$ no nível de 95 % de confiança. O modelo estatístico obtido para a produção lipídica da microalga *Chlorella* sp. gerou a superfície de respostas apresentada na Figura 9.

Figura 9. Superfície de respostas para o teor lipídico produzido por algas *Chlorella sp.* obtida seguindo o planejamento composto central. x_1 é o valor codificado para zinco e x_2 é o valor codificado para biotina



De acordo com a superfície de respostas da Figura 9 o maior teor lipídico para as algas *Chlorella* sp. é obtido quando o valor de x_1 é próximo de -1,4 e de x_2 próximo a +1,4. Isto implica que os valores experimentais para estes dois fatores correspondem, respectivamente, a baixa concentração de zinco e alta concentração de biotina.

Conforme os ensaios 3 e 4 em que o ensaio 3 foi submetido a menor concentração de zinco, e obteve maior produção em teor lipídico, da mesma forma os ensaios 2,e 4, onde o ensaio 4 foi submetido a maior quantidade de biotina e produziu maior porcentagem em produção de lipídios

Foi verificado que a concentração de nutrientes apresentou um eixo sobre a resposta, pois o acúmulo de lipídios atinge um valor máximo quando a concentração de biotina é de 170% atingindo a maior porcentagem em teor lipídico de 51,54%. Verificou-se ainda que para valores de concentração de biotina inferiores, o modelo prevê uma redução no acúmulo de lipídeos, demonstrado pelos ensaios 1, 2 e 10, quando os mesmos foram inseridos a baixas concentrações de biotina resultando em uma redução no acúmulo de lipídeos.

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

Trevisan (2019), o qual avalia a influência da concentração dos nutrientes, nitrogênio e fósforo, em suas condições experimentais, obtendo um rendimento de 12,7% à 17,9% de teor lipídico, demonstrando assim que a porcentagem lipídica é elevada, a medida que ocorre restrição nutricional.

Nesse contexto podemos observar que o melhor resultado para a variável zinco foi quando o mesmo foi submetido a baixas concentrações, tendo como resultado em porcentagens de teor lipídico 42,64%, e 39,12%.

Levando em consideração que os custos com o meio nutricional de cultivo para microalgas é caro, sendo um dos fatores limitantes para produção e conversão em biodiesel, Praveenkumar et al. (2012) cultivaram *chlorella sp.* em meio Chu com redução de nutrientes , obtendo 41% de lipídeos totais.

Hakalin,(2014), observou claramente que a densidade celular em biomassa, foi diretamente influenciada pelas concentrações de nutrientes ao comparar dois meios distintos, com 38% menos de nutrientes com adição de vitamina, verificou-se que com este foi possível aumentar 55% de T/L.

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

A porcentagem lipídica extraída do experimento em questão, se mostrou satisfatória (de 20,19% à 51,54%), quando correlacionada com a literatura, onde a microalga *Chlorella sp.* por exemplo apresenta de 31,2% a 54,7% de lipídeos de acordo com os autores Praveenkumar, e Ruangsomboon (2012). Porém é necessário dar seguimento aos experimentos em busca de melhorar ainda mais as condições de cultivo empregadas, possibilitando melhores resultados nos ensaios em geral, sabendo que para o seguimento dessa pesquisa, se faz necessário o uso de constante de aeração, novas técnicas de extração mais aprimoradas, e meios de cultivos mais adequados e atualizados de acordo com a literatura, contribuindo para um rendimento ainda mais promissor, com redução de custos e homogêneo (SATI, 2019)

7 CONCLUSÕES

Através da pesquisa, foi possível estimar as melhores condições de cultivo, testando duas espécies distintas de microalgas, *Chlorella sp.*, e *Scenedesmus sp.*, com diferentes concentrações, de nitrato, ferro, zinco e adição de biotina, no meio sintético Chu.

Entre os resultados preliminares obtidos, pode-se observar que a microalga *Chlorella sp.* se adaptou melhor em todas as condições inseridas, obtendo melhor resultado quando cultivada com redução da variável nitrato, gerando um rendimento de 20,19% em teor lipídico.

Quando observamos a variável ferro, de acordo com o valor negativo mostrado pela tabela de efeito, nota-se que a mesma indicou que quanto maior a concentração de ferro no meio de cultivo menor será a obtenção do teor lipídico na biomassa produzida pelas microalgas. Entendendo assim, que as espécies de microalgas não se adaptaram ao aumento de ferro.

Além disso na primeira etapa do experimento pode-se notar através da leitura de crescimento celular, que os ensaios em geral, apresentaram maior crescimento celular entre o décimo quinto dia ao vigésimo dia, com isso concluímos que 20 dias seria o tempo mais indicado para dar seguimento a pesquisa, pois após esse período poderia iniciar um decréscimo celular, devido o alto consumo de nutrientes pelas algas.

Para última etapa da pesquisa, foi avaliado as seguintes variáveis: concentração de zinco no meio Chu (%) e concentrações diferentes de biotina, sendo fundamentado pelo planejamento estatístico do tipo planejamento composto central (PCCR).

De acordo com a superfície de resposta o maior teor lipídico para as microalgas *Chlorella sp.* foi obtido quando o valor de x_1 é próximo de 30% e de x_2 próximo a 170%. Isto implica que os valores experimentais para estes dois fatores correspondem, respectivamente, a baixa concentração de zinco e alta concentração de biotina.

A porcentagem lipídica extraída do experimento em questão, se mostrou satisfatória (de 20,19% à 51,54%), mostrando que a otimização do meio de cultivo, contribuiu para o aumento de produção de lipídios.

Nesse contexto podemos observar que o melhor resultado para a variável zinco foi quando o mesmo foi submetido a baixas concentrações, tendo como resultado em porcentagens de teor lipídico 42,64%, e 39,12%.

Com isso, baseando-se nos resultados para a otimização do meio Chu no cultivo de *Chlorella sp.*, concluiu- se que a redução de nitrato, zinco, podem ter efeitos significativos sobre a produtividade em lipídeos; sabendo ainda

que a redução de nutrientes no meio de cultivo, podem trazer redução de custos de produção, o que poderia aproximar ainda mais a utilização dessa matéria prima para produção e comercialização de biodiesel.

Assim como a inserção de biotina, apresentou estatisticamente resultados promissores, em termos de produção lipídica, conforme apresentados no ensaio 11.

Entretanto, entende-se necessário o aprimoramento dessa otimização, afim de evidenciar e melhorar ainda mais as condições de cultivo empregadas, possibilitando melhores resultados nos ensaios em geral, sabendo que para o seguimento dessa pesquisa, se faz necessário o uso de constante de aeração, novas técnicas de extração mais aprimoradas, e meios de cultivos mais adequados e atualizados de acordo com a literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIOLI,T,S; **cultivo de microalga chlorella sp, em pequena escala visando o aumento da produção de biomassa e óleos para o biodiesel**, universidade de São Paulo , São Carlos 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2010). Biologia molecular da célula. Ed. Artmed, Porto Alegre, RS, 5^a ed. 1396 p.

ANDERSEN, R. A. (2005). Algal culturing techniques. Ed. Elsevier Academic Press,USA, 578 p.

ARCEO, A. A. **Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas Scenedesmus dimorphus e Nannochloropsis oculata**. Tese (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2014). Resolução ANP nº 14 de 11/05/2012, D.O.U. de 18.05.2012. Disponível em www.anp.gov.br. Acesso em Agosto de 2014.

AZEREDO, V.B.S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BEN-AMOTZ, A. (1995). **New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for beta-carotene production**. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, p. 65–68.

BLERSCH, D.M.; KANGAS, P.C.; MULBRY, W.W. (2013). **Turbulence and nutrient interactions that control benthic algal production in an engineered cultivation raceway**. *Algal Research*, v. 2, p. 107-112.

BRENNAN, L. & OWENDE, P. (2010). Biofuels from microalgae - **a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557–77.

Brasil, B. S. A; Silva,F.C.P; Siqueira, F.G Microalgae, biorefineries: The Brazilian scenario in perspectiva. New Biotechnology,2016.

BORGES, W. S; ARAÚJO, B. S. A; MOURA, L. G; MORAIS JÚNIOR, W. G, RESENDE, M. M; CARDOSO, V. L. **Comportamento de microalgas** *Scenedesmus* sp., *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella* sp **em relação ao teor de lipídeos e biomassa**. São Paulo, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/witte/Downloads/Bioenergia1%20Wesley.pdf>. Acesso: 02 ago. 2017.

CHAICHALERM, S.; POKETHITIYOOK, P.; YUAN, W.; MEETAM, M.; SRITONG, K.; PUGKAEW, W.; KUNGVANSAICHOL. K.; KRUATRACHEU, M.; DAMRONGPHOL, P. (2012). Culture of microalgal strain isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, v. 89, p. 296-302.

CHISTI, Y. (2007). Biodiesel from microalgal. *Biotechnology Advances*, v. 25, p.294–306.

CHEN, C.; YEH, K.; AISYAH, R.; LEE, D.; CHANG J. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, 102, p. 71–81, 2011.

CHU, SP. The influence of the mineral composition if the medium on the growth of planktonic algae. (1942) *J. Ecol.*, 30, 284-325.

COUGO, Cecília Dutra Garcia. **Utilização da técnica infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para estimativa das concentrações de carboidratos e de lipídeos em *Scenedesmus* sp.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 2017.

DEMIRBAS, Ayhan; DEMIRBAS, M. Fatih. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy conversion and management**. v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

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

DIAS, Fernando Gallego. **Modelagem, ajuste e validação experimental do processo de geração de hidrogênio via cultivo de microalgas em fotobiorreatores compactos.** 2017.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Revista Embrapa Agroenergia.** Aracajú, SE. ISSN 2238-1023. Ano IV. n°10, dezembro, 2016.

ERAZO, Róbinson Geraldo Trindade Portilla. **Isolamento, seleção e cultivo em meio sintético e vinhaça demicroalgas com potencial para a produção de biodiesel.** 2017

EGAN, P.F. & TRAINOR, F.R. (1989). The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae). *Journal Phycology*, v. 25, p. 65-70.

ESPINOSA, L.; Tapanes, N. L. C. O.; Aranda, D. A. G.; Cruz, Y. R. As microalgas como fonte de produção de biodiesel: discussão de sua viabilidade. **Acta Scientiae & Technicae.** v. 2, n. 1, jun. 2014.

FERRÉS, J.D. (2012). Biodiesel – desafios e oportunidades. In *Combustíveis no Brasil, Desafios e Perspectivas*, Ed. Synergia, Rio de Janeiro, 298 p.

FONTOURA, Juliana T. *et al.* Estudo de um consórcio de microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de curtume. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 743-752, 2017.

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

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; DA CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L.; ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, Vol. 36, No. 3, 437-448, 2013.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y. (2013). Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 396-401.

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

GOUVEIA, E. R.; HOKKA, C. O.; BADINO-JR, A. C. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, p. 363-374, 2003.

GOES, H. H. D. **Estudo da produção de biodiesel catalisada por líquidos iônicos.** [s.l.] p. 101397, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101397>

GOUVEIA, Luísa *et al.* Microalgae biomass production using wastewater: treatment and costs: scale-up considerations. *Algal Research*, v. 16, p. 167-176, 2016.

HAKALIN,N,L,S; Otimização das condições de cultivo da microalga *scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel; Instituto de Ciências Biológicas Universidade de Brasília 2014

HENRARD,A,S,A; **Cultivo semicontínuo das microalgas *cyanobium* sp. e *chlorella* sp.** Programa de pós-graduação em engenharia e ciência de alimentos, Universidade Federal do Rio Grande - furg escola de química e alimentos , 2009.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERG, M.; DARZINS, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, v. 54, p. 621-639.

JI, F.; LIU, Y.; HAO, R.; LI, G.; ZHOU, Y.; DONG, R. (2014). Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 200-207.

KLEIN, Amanda Pérez. **Avaliação de diferentes fotobiorreatores para cultivo de microalgas.** Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Curso de Engenharia Química. 2015

LEE, R.E. (2008). *Phycology*. Ed. Cambridge University Press, New York, US, 4th edition, 547 p.

LOURENÇO, S. **Cultivo de microalgas Marinhas- princípios e aplicações.** São Carlos: Rima, 2006.

LI, Z.; YUAN, H.; YANG, J.; LI, B. (2011). **Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341.** *Bioresource Technology*, v. 102, p. 9128- 9134.

LOURENÇO, S. O. (2006). **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações.** Ed. Roma, 1^a ed., São Paulo, 606 p.

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

MACHADO M, F, **Cultivo de microalgas (chlorella sp. e ankistrodesmus sp. – chlorophyceae) em água resíduária suplementada com uréia e co2**, Viçosa Minas Gerais – Brasil 2011

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). Departamento da cana-de-açúcar e agroenergia. Produção brasileira de etanol. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em Agosto de 2014.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 217–232

MORAIS, KELLI C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos.** 98 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

OLIVEIRA, C. J.; SCHAFFNER, R. A.; CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; TELEKEN, J. G. Produção de biodiesel a partir das algas: uma revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, v.3, n. especial, p.202-221, 2014.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, v. 23, n. 2 ,p. 207-216.

PEQUENO, M, A, G; **Avaliação do Potencial Produtivo de Óleos Obtidos a Partir de Microalgas por Cromatografia Gasosa;** João Pessoa – PB - Brasil Setembro/2010.

PEREIRA FILHO, S. M.; CUNHA, M. C. C.; DRUMMOND, A. R.; DANTAS, D. M. M.; GÁLVEZ, A. O. Matéria-prima do Biodiesel com Curto Tempo de Coleta: Microalga (*Scenedesmus subspicatus*). **In: II Seminário Biodiesel Fonte de Energias das Oleaginosas em Pernambuco: Evolução do Cenário e Novas Perspectivas no Brasil**, 2010, Pernambuco.

PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga chlorella biochemical systematic an ecology, v.35, p 281-285, 2007.

PRABAKARAN, P.; RAVIDRAN, A.D. A Comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in applied microbiology**, v. 53. P. 150-154, 2011.

REBOLLOSO-FUENTES, M. M.; NAVARRO-PÉREZ, A.; GARCÍA-CAMACHO, F.; RAMOS-MIRAS, J. J.; GUIL-GUERRERO, J. L. Biomass Nutrient Profiles of the Microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2966-2972, 2001.

REYNOLDS C. S. (2006). Ecology of Phytoplankton - Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge.

RASOUL-AMINI,S.ET AL, chlorella sp. a new strain whith highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *applied energy* , V. 88,N.10,P.3354-3356,2011.

RICHMOND, A.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; KOPEL, R. (2003). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoor. *Journal of Applied Phycology*, v.5, v. 327 – 332.

ROUND, F.E. (1973). Biology of the algae. Publishers Ltd, London, 263 p.

RUANGSOMBOOM, S. (2012). Effect of light, nutriente, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga *Botryococcus braunii* KMITL2. *Bioresource Technology*, v. 109, p. 261-265.

SILVA, N.L.C.; BETANCUR, G.J.V.; VASQUEZ, M.P.; GOMES, E.B.; PEREIRA Jr. (2011). Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.163, p. 928-936.

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

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

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. (2006). Review: commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87–96.

SUALI, E. & SARBATLY, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 4316– 4342. REYNOLDS C. S. (2006). Ecology of phytoplankton: ecology, biodiversity and conservation. Ed. Cambridge.

QIN, Chao; LEI, Yuling; WU, Jing. Light/dark cycle enhancement and energy consumption of tubular microalgal photobioreactors with discrete double inclined ribs. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 28, 2018.

QIN, Chao; WU, Jing. Influence of successive and independent arrangement of Kenics mixer units on light/dark cycle and energy consumption in a tubular microalgae photobioreactor. **Algal Research**, v. 37, p. 17-29, 2019.

RAMIREZ, Nelzy Neyza Vargas. **Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em vinhaça**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.2013.

SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A.; AZEVEDO, M. T. P.; MELCHER, S. S.; WERNER, V. R.; MALONE, C. F. S.; ROSSINI, E. F.; JACINAVICIUS, F. R.; HENTSCHKE, G. 71 S.; OSTI, J. A. S.; SANTOS, K. R. S. S.; GAMA-JUNIOR, W. A.; ROSAL, C.; ADAME, G. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. **Instituto de Botânica**, 2012.

SANTOS, Ana Carolina dos. **Análise da toxicidade de água de rio contaminada com herbicida ametrina utilizando colunas de Winogradsky e microalgas como bioindicadoras**. 2016. 51 f. Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências (Campus de Rio Claro), 2016.

SANTOS, Beatriz. **Redução do custo da produção de biomassa microalgal como matéria prima para biodiesel**.Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para conclusão do curso. 2013.

SILVA, Debora Andreatta. **Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel.** Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná. 2014

SILVA, M. R. L.; SCHERER, A.; ANDRADE, D. S. **Formação e manutenção de coleção ex situ unialgal in vivo.** In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Ed.). Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios de cultivo. Londrina: IAPAR, 2014. v. 1, p. 75-142.

SIMIONATO, Diana *et al.* Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. **Biophysical chemistry**, v. 182, p. 71-78, 2013.

SINGH, A.; OLSEN, S.I. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Applied Energy**, v. 88, p. 3548-3555, 2011.

TAHER, Dhyogo Miléo. Biodiesel de microalgas cultivadas em dejeto suíno biodigerido. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná. 2013.

TORNABENE, T. G.; HOLZER, G.; LIEN, S.; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 6, p. 435-440, 1983.

TOMAS, Cristiane. **Cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em água de maceração do milho e extração e quantificação de lipídeos.** 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2016.

XIN, L.; YING, H.H.; KE, G.; XUE, S.Y. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494– 5500.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3098–3102.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*, v. 126, p. 499–507.