



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



WITTER DUARTE GUERRA

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE CO-CULTIVO DE MICROALGAS E
CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS COM OBJETIVO DE AVALIAR SEU POTENCIAL
PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA, ÓLEO, BIODIESEL *in situ* E BIOCHAR

ITUIUTABA – MG

2024

WITTER DUARTE GUERRA

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE CO-CULTIVO DE MICROALGAS E
CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS COM OBJETIVO DE AVALIAR SEU POTENCIAL
PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA, ÓLEO, BIODIESEL *in situ* E BIOCHAR

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia/ Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Química como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Área de concentração: Biomassas energéticas: ciência e tecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista

Co-orientador: Prof. Dr. Anizio Márcio de Faria

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Matheus da Rocha

ITUIUTABA – MG

2024



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 029, PPBGBIOCOM				
Data:	14 de agosto de 2024	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	18 horas e 00 mins
Matrícula do Discente:	12013PGB005				
Nome do Discente:	Witter Duarte Guerra				
Título do Trabalho:	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE CO-CULTIVO DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS COM OBJETIVO DE AVALIAR SEU POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA, ÓLEO, BIODIESEL <i>in situ</i> E BIOCHAR				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Biomassas energéticas: ciência e tecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Cultivo de microalgas e frutos do cerrado para obtenção de biodiesel.				

Reuniu-se em ambiente virtual, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta pelos Professores Doutores: Vivian Machado Benassi, da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri; Marita Gimenez Pereira, da Universidade do Estado de Minas Gerais; Roberto Ruller, da Universidade Federal do ABC; Rosana Maria Nascimento de Assunção, da Universidade Federal de Uberlândia; e Antônio Carlos Ferreira Batista, orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

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 **Rosana Maria Nascimento de Assunção, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/08/2024, às 10:00, 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 **Antonio Carlos Ferreira Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/08/2024, às 15:07, 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 **Roberto Ruller, Usuário Externo**, em 19/08/2024, às 11:39, 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 **Vivian Machado Benassi, Usuário Externo**, em 19/08/2024, às 13:41, 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 **Marita Gimenez Pereira, Usuário Externo**, em 19/08/2024, às 15:08, 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 **5536112** e o código CRC **0D6D1145**.

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

G934 2024	<p>Guerra, Witter Duarte, 1990- CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE CO-CULTIVO DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS COM OBJETIVO DE AVALIAR SEU POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA, ÓLEO, BIODIESEL in situ E BIOCHAR [recurso eletrônico] / Witter Duarte Guerra. - 2024.</p> <p>Orientador: Antônio Carlos Ferreira Batista. Coorientador: Anizio Márcio de Faria. Coorientador: Lucas Matheus da Rocha. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biocombustíveis. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.623 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Biocombustível. I. Batista, Antônio Carlos Ferreira, 1973-, (Orient.). II. Faria, Anizio Márcio de, 1977-, (Coorient.). III. Rocha, Lucas Matheus da, 1981-, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biocombustíveis. V. Título.</p> <p>CDU: 662.756</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

DEDICATÓRIA

A minha querida família, com um agradecimento especial aos meus pais, José dos Reis Guerra e Sônia Duarte Guerra, aos meus irmãos Jéssica Duarte Guerra e Wallas Duarte Guerra, a minha filha Emanuelle da Silva Duarte aos meus sobrinhos Davi Alves Guerra e Laura Alves Guerra, ao meu namorado Walyssom Miranda e aos estimados amigos Karolynne Albuquerque, Pablo Martins, Flávia Costa e Jaqueline Chiesa. Sou imensamente grato pelo apoio contínuo e incondicional, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível. Expresso minha gratidão a todos os professores que participaram e contribuíram de alguma forma para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e proteção. Expresso meu profundo amor e gratidão aos meus familiares, que, mesmo à distância, sei que torceram por mim. Especialmente aos meus pais, José dos Reis Guerra e Sônia Duarte Guerra, pelo cuidado amoroso e prontidão. Aos meus irmãos Jéssica Duarte Guerra e Wallas Duarte Guerra, pelo apoio ao longo da minha jornada. Um agradecimento especial à minha filha Emanuelle da Silva Duarte e aos meus sobrinhos Davi Guerra e Laura Guerra, que trouxeram alegria nos momentos de tristeza ou cansaço.

Ao meu companheiro de vida, Walyssom Miranda, que não apenas me auxiliou nas áreas de estatística, bioestatística e matemática em meu trabalho, mas também me aconselhou, incentivou e contribuiu significativamente com apoio e amor em cada etapa. Quando eu não estava bem, você estava lá.

Agradeço aos meus filhos de quatro patas, Bradoock, Holly e Chico, que eu tanto amo, e aos que estão morando no céu, Pipoca, Lipe, Meg, Snoopy, Kessy, Nike e Duke. Saibam que vocês fazem e fizeram grande diferença em minha vida, e vou amá-los eternamente.

À Flávia Costa e ao Pablo Martins, pela amizade, companheirismo, conselhos, parceria e colaboração em pesquisas durante o curso e na vida. Em especial, à Karolynne Albuquerque, pela atenção, dedicação, amizade, conselhos, viagens e pesquisa. Sua ajuda foi fundamental nos momentos em que eu estava sem rumo e distante da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista, pela confiança, conselhos, orientação e, acima de tudo, pelas oportunidades. Agradeço aos professores Prof. Dr. Anízio Marcio de Faria e Prof. Dr. Lucas Matheus da Rocha, pela força, motivação e disposição em atender e aconselhar quando a pesquisa enfrentou desafios, especialmente após a pandemia e os problemas no laboratório.

Em especial, agradeço à professora Prof. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção, que, entre seus compromissos, sempre encontrava tempo para me atender com carinho, educação e cuidado extremo.

Agradeço sinceramente à banca de doutorado pela valiosa contribuição, dedicação e rigor acadêmico que enriqueceram significativamente este trabalho, e pelo aceite na participação.

Aos colegas de curso e do laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar em todos os momentos. À equipe de professores pelo apoio e dicas construtivas, além das reflexões durante as aulas, e aos servidores da UFU – Uberlândia e UFU – Ituiutaba. Aos professores da Universidade dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, que contribuíram para minha formação por meio das disciplinas cursadas e apoio com as microalgas e cianobactérias.

Ao curso de Química do Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara – ILES/ULBRA, que nos ofereceu todo o apoio necessário para o início dos experimentos com microalgas. Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Afinal, aquilo que amamos sempre será parte de nós.”

Joanne Kathleen Rowling

RESUMO

As microalgas e cianobactérias estão ganhando espaço na área de biocombustíveis, pois esses microrganismos possuem um alto potencial de acúmulo de lipídios e biomassa, o que permite estudos para explorar esses organismos como matéria-prima para a produção de biodiesel, biodiesel *in situ* e biochar. A co-cultura de microalgas é uma das principais opções para viabilizar eventos positivos relacionados à síntese de biocombustíveis. Nos sistemas algas-cianobactérias, as algas crescem em grupos ou colônias que interagem ou competem entre si. As interações cooperativas entre microalgas podem promover a utilização de nutrientes do sistema e o crescimento de microalgas e cianobactérias. Dentre as variáveis que podem interferir no co-cultivo, fatores biológicos, físicos e químicos afetam diretamente o armazenamento metabólico das reservas de nutrientes das microalgas e cianobactérias. Ao desenvolver meios otimizados para a produção de lipídeos obtidos da co-cultura, é importante explorar metodologias para melhorar o crescimento da biomassa e os sistemas de colheita. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de otimizar o cultivo da microalga *Chlorella* sp. e da cianobactéria *Oscillatoria* sp. em sistema de co-cultura, para posterior produção de lipídios, biomassa, biodiesel *in situ* e biochar. O co-cultivo ocorreu em reatores de vidro no regime de batelada, com aeração presente em todo o cultivo mantidos em temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 21 dias de cultivo, fotoperíodo controlador de 12h de luz e 12h de escuro. As condições nutricionais testadas consistiram no teor de fosfato, nitrato e zinco de acordo com o planejamento experimental Dohlert para garantir o rendimento de biomassa, lipídios, produção de biodiesel e biochar. Os resultados indicaram que a metodologia experimental para o co-cultivo apresentou um aumento de 43,45% no teor de lipídios com as seguintes concentrações finais: fosfato 22,400 g, nitrato 0,255 g e zinco 0,030 g. Em termos de biomassa, houve um aumento de 64,53% com os valores finais de fosfato 22,400 g, nitrato 0,170 g e zinco 0,480 g. As interações entre as diferentes espécies de microalgas e cianobactérias foram positivas, resultando em rendimentos superiores aos relatados na literatura para outras espécies de microalgas e cianobactérias.

Palavras-chave: Microalgas. Cianobactérias. Co-cultivo. Biomassa. Lipídios.

ABSTRACT

Microalgae and cyanobacteria are gaining prominence in the field of biofuels due to their high potential for lipid and biomass accumulation. This characteristic makes them promising raw materials for the production of biodiesel, in situ biodiesel, and biochar. Microalgae co-culture is one of the main strategies to promote positive outcomes related to biofuel synthesis. In algae-cyanobacteria systems, algae grow in groups or colonies that interact or compete with each other. Cooperative interactions among microalgae can enhance nutrient utilization within the system and promote the growth of both microalgae and cyanobacteria. Biological, physical, and chemical factors directly affect the metabolic storage of nutrient reserves in microalgae and cyanobacteria, which can interfere with co-cultivation. To develop optimized methods for lipid production from co-culture, it is important to explore methodologies that improve biomass growth and harvesting systems. This study aimed to optimize the cultivation of the microalga *Chlorella* sp. and the cyanobacterium *Oscillatoria* sp. in a co-culture system for the subsequent production of lipids, biomass, in situ biodiesel, and biochar. The co-culture was conducted in glass reactors in batch mode, with aeration maintained throughout the cultivation period at an ambient temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The cultivation lasted 21 days, with a controlled photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of dark. The nutritional conditions tested included phosphate, nitrate, and zinc levels, according to the Dohler experimental design, to ensure the yield of biomass, lipids, biodiesel, and biochar. The results indicated that the experimental methodology for co-cultivation led to a 43.45% increase in lipid content with the following final concentrations: phosphate 22.400 g, nitrate 0.255 g, and zinc 0.030 g. In terms of biomass, there was a 64.53% increase with the final values of phosphate 22.400 g, nitrate 0.170 g, and zinc 0.480 g. The interactions between the different species of microalgae and cyanobacteria were positive, resulting in yields higher than those reported in the literature for other species of microalgae and cyanobacteria.

Keywords: Microalgae, Cyanobacteria, Co-culture, Biomass, Lipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos combustíveis segundo a fase e modelo de aplicação.....	26
Figura 2 - Consumo de energia nos transportes em 2019.....	27
Figura 3 - Perspectivas globais de demanda de produtos refinados de 2017 a 2040.....	28
Figura 4 - Participação de biocombustíveis nos transportes no Brasil de 2010 a 2019.....	29
Figura 5 - Conceito de biorrefinarias no Brasil.....	30
Figura 6 - Matriz energética brasileira em 2019.....	30
Figura 7 - Refinaria de petróleo versus biorrefinaria.....	31
Figura 8 - Histórico do desenvolvimento do biodiesel no Brasil.....	33
Figura 9 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.....	35
Figura 10 - Rotas para produção de biodiesel.....	35
Figura 11 - Etapas e preparação da microalga para produção de biodiesel.....	37
Figura 12 - Esquema de obtenção e aplicação de biochar a partir de biomassa.....	38
Figura 13 - Exemplo de produção de biocarvão a partir do bagaço de laranja em um processo de carbonização por 55 minutos.....	39
Figura 14 - Divisão dos seres vivos em três domínios.....	43
Figura 15 – Esquema básico da organização celular das organelas da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (A). Representação esquemática da microalga <i>Euglena</i> sp. (B). Representação esquemática da microalga <i>Ceratium</i> sp. (C).....	45
Figura 16 - Fluxograma sobre os processos de conversão e produtos gerados a partir da biomassa de microalga.....	49
Figura 17 - <i>Chlorella vulgaris</i>	50
Figura 18 - Cianobactérias.....	52
Figura 19 – Representação esquemática de uma biofábrica cianobactéria e suas possibilidades biotecnológicas (A). Estrutura básica de uma cianobactéria (B). Exemplificação de alguns gêneros de cianobactérias (C).....	53
Figura 20 - Condições operacionais para cultivo de microalgas e cianobactérias.....	64
Figura 21 - Fluxograma da abordagem metodológica empregada nos testes preliminares.....	64
Figura 22 - Meio de cultivo ASM1 (modificado) armazenado em vidro âmbar.....	65
Figura 23 - Inóculo de 20% (200 mL) para cultivo em um sistema de co-cultura de microalga e cianobactérias.....	67

Figura 24 – Fluxograma da abordagem metodológica empregada.....	70
Figura 25 - Co-cultura de microalgas e cianobactérias.....	71
Figura 26 - Lupa eletrônica Leica.....	74
Figura 27 - Microscópio Nikon Eclipse E200.....	75
Figura 28 - Processo de centrifugação e secagem posterior ao co-cultivo de microalgas e cianobactérias depois de 20 dias de cultivo.....	76
Figura 29 - Processo de centrifugação e secagem posterior ao co-cultivo de microalgas e cianobactérias depois de 20 dias de cultivo.....	77
Figura 30 - Biomassa seca co-cultura de microalgas e cianobactérias. (A) Biomassa seca retirada da estufa de secagem. (B) Biomassa seca no processo de maceração (C) Biomassa no final do processo de maceração.....	77
Figura 31 - Procedimento de extração lipídica utilizando banho clorofórmio, metanol, banho ultrassônico e centrifugação utilizando a biomassa seca macerada.....	78
Figura 32 - Procedimento de extração lipídica utilizando banho clorofórmio, metanol, banho ultrassônico e centrifugação utilizando a biomassa seca macerada.....	79
Figura 33 - Lipídeos extraídos da co-cultura de microalgas e cianobactérias a partir do método de Folch (1956)	79
Figura 34 – Esquema do estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo para obtenção de lipídeos.....	83
Figura 35 – Esquema do estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo para obtenção de biomassa.....	83
Figura 36 - Reação de transesterificação ácida in situ.....	88
Figura 37 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga <i>Chlorella</i> sp. em um sistema de co-cultivo com uma espécie de cianobactéria <i>Oscillatoria</i> sp. 21 dias de cultivo (Ensaio 1)	90
Figura 38 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga <i>Chlorella</i> sp. em um sistema de co-cultivo com uma espécie de cianobactéria <i>Oscillatoria</i> sp. 21 dias de cultivo (Ensaio 5)	91
Figura 39 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga <i>Chlorella</i> sp. em um sistema de co-cultivo com uma espécie de cianobactéria <i>Oscillatoria</i> sp. 21 dias de cultivo (Ensaio 4)	94
Figura 40 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga <i>Chlorella</i> sp. em um sistema de co-cultivo com a cianobactéria <i>Oscillatoria</i> sp. (Ensaio 12)	95

Figura 41 - Leitura de pH em relação ao tempo de cultivo da co-cultura de microalgas e cianobactérias. Figura 50-A (Cultivo 1) e Figura 50-B (Cultivo 2)	96
Figura 42 - Co-cultura de microalgas e cianobactérias com aumento de 400 x.....	99
Figura 43 - Prolongamentos dos filamentos das cianobactérias em comparação as microalgas na co-cultura com aumento de 400 x.	100
Figura 44 - Microscopia de luz de uma espécie de microalgas do gênero <i>Chlorella</i> em colônia em um sistema de co-cultura com aumento de 400 x.....	101
Figura 45 - Estereomicroscópio preparado para observação da co-cultura de microalgas e cianobactérias utilizando a iluminação invertida.....	103
Figura 46 - Estereomicroscopia com luz invertida para visualização do cultivo de microalgas e cianobactérias.....	104
Figura 47 - Estereomicroscopia com luz invertida para visualização de estruturas celulares de cianobactérias (Azul) e microalgas (Vermelho).....	104
Figura 48 - Estereomicroscopia do co-cultivo de microalgas e cianobactérias com a ausência da luz invertida.....	105
Figura 49 - Estereomicroscopia em co-cultivo de microalgas e cianobactérias. A (Presença de luz invertida) e B (Ausência de luz invertida)	106
Figura 50 - Estereomicroscopia de materiais biológicos após o co-cultivo de microalgas e cianobactérias. A e B apresenta a biomassa (com diferentes ampliações) após o processo de secagem e maceração. C e D apresenta o óleo das microalgas e cianobactérias (com diferentes ampliações) após o processo de extração lipídica.....	107
Figura 51 - Superfície de resposta para as relações nutricionais entre zinco, fosfato e nitrato. A – Gráfico zinco vs. Fosfato. B – Nitrato vs. Fosfato. C – Nitrato vs. Zinco.....	113
Figura 52 - Superfície de resposta para as relações nutricionais entre zinco, fosfato e nitrato, relacionado ao rendimento de biomassa. A – Gráfico (Nitrato vs. Zinco). B – Gráfico (Zinco vs. Fosfato). C – Gráfico (Nitrato vs. Fosfato)	115
Figura 53 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 141x.....	119
Figura 54 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 1042x.....	119
Figura 55 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 1611x.....	120
Figura 56 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 1909x.....	120

Figura 57 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 2563x.....	121
Figura 58 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 2563x.....	121
Figura 59 - Análise termogravimétrica da biomassa pura da co-cultura entre microalgas e cianobactérias. A – Atmosfera com ar sintético. B- Atmosfera inerte.....	141
Figura 60 - Espectros obtidos na região do infravermelho para biomassa de microalgas e cianobactérias cultivadas em co-cultura.....	144
Figura 61 - Espectros obtidos na região do infravermelho para o óleo de microalgas e cianobactérias cultivadas em co-cultura.....	145
Figura 62 - Espectros obtidos na região do infravermelho do biodiesel <i>in situ</i> de microalgas e cianobactérias cultivadas em co-cultura.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processo de conversão termoquímica.....	40
Tabela 2 - Espécies de microalgas e seus principais produtos comerciáveis.....	46
Tabela 3 - Elementos necessários para o crescimento de cianobactérias e microalgas e suas funções metabólicas.....	58
Tabela 4 - Comparação das características de diferentes tipos de cultivos de microalgas.....	60
Tabela 5 - Composição do meio de cultivo ASM1 modificado para co-cultura de microalgas e cianobactérias.....	66
Tabela 6 - Matriz de experimentos DOEHLERT para cultivo de microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura.....	69
Tabela 7 - Composição de vitaminas inseridas no meio de cultivo da co-cultura entre microalgas e cianobactérias.....	81
Tabela 8 - Concentração das vitaminas testadas.....	82
Tabela 9 - Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa em um sistema de co-cultivo de microalgas e cianobactérias.....	92
Tabela 10 - Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa em um sistema de co-cultivo de microalgas e cianobactérias.....	109
Tabela 11 – Comparação do teor lipídico da co-cultura entre microalgas e cianobactérias com a literatura.....	110
Tabela 12 – Tabela da análise de variância para rendimento de biomassa.....	116
Tabela 13 – Resultados para quantidade de biomassa seca para cultivo de biochar.....	118
Tabela 14 – Resultados da reprodutibilidade experimental com novos valores para fosfato, nitrato e zinco visando quantidade de óleo e teor de lipídeos.....	124
Tabela 15 – Resultados da reprodutibilidade experimental com novos valores para fosfato, nitrato e zinco visando quantidade de biomassa.....	125
Tabela 16 - Concentração das vitaminas testadas com valores alterados de fosfato, nitrato e zinco para otimização de rendimento lipídico.....	126
Tabela 17 - Concentração das vitaminas testadas com valores alterados de fosfato, nitrato e zinco para otimização de rendimento lipídico.....	129
Tabela 18 - Análise imediata da co-cultura entre microalgas e cianobactérias em comparação com outras microalgas e cianobactérias presentes na literatura.....	131

Tabela 19 - Comparação dos valores da análise elementar obtidas pelo autor em relação a literatura.....	133
Tabela 20 – Síntese dos valores da análise elementar obtidos pelo autor comparados com a literatura para produção de biodiesel e biochar.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

TL - Teor de lipídeos

MO - Massa de óleo produzida

ha – Hectare

g/L – Gramas por litro

mL – Mililitro

V – Volt

UV – Radiação ultravioleta

kHz – Quilo Hertz

rpm – Rotações por minuto

KCl – Cloreto de Potássio

~ – Aproximadamente

TGA – Análise termogravimétrica

EMPRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

W – Watt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 – Objetivo geral.....	24
2.2 – Objetivos específicos.....	24
3. REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1 – Combustíveis fósseis e Biocombustíveis.....	25
3.2 – Biodiesel.....	32
3.3 – Biochar.....	37
3.4. Microalgas e cianobactérias.....	42
3.4.1. Microalga <i>Chlorella</i> sp.....	49
3.4.2. Cianobactérias <i>Oscillatoria</i> sp.....	51
3.4.3. Fatores importantes para o cultivo de microalgas e cianobactérias.....	56
3.4.3.1. Condições nutricionais.....	57
3.4.3.1.1. Nitrogênio.....	58
3.4.3.1.2. Zinco.....	59
3.4.3.1.3. Fosfato.....	59
3.4.3.2. O cultivo de microalgas e cianobactérias.....	59
3.4.3.3. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias.....	60
4. METODOLOGIA	63
4.1. Microalgas e cianobactérias.....	63
4.1.1. Co-cultura de microalgas e cianobactérias.....	63
4.2. Testes preliminares.....	64
4.2.1. Cultivo de microalgas-cianobactérias em um sistema de co-cultura.....	65
4.3. Matriz de experimentos DOEHLERT para cultivo de microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura e metodologia empregada.....	68
4.4. Quantidade de inóculo.....	70
4.5. Unidade experimental e condições de cultivo.....	71
4.6. Meio de cultivo.....	72
4.7. Avaliação de crescimento celular através de espectroscopia e biomassa seca produzida.....	72
4.8. pH.....	72
4.9. Idade do inóculo.....	73

4.10. Análise Microscópica (estereomicroscópio e microscópio de luz)	73
4.11. Avaliação e rendimento dos cultivos.....	75
4. 12. Determinação do peso seco da biomassa e quantidade de óleo.....	76
4.13. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
4.14. Reprodutibilidade dos experimentos.....	80
4.15. Adição de vitaminas ao meio de cultivo na co-cultura de microalgas e cianobactérias visando rendimento de óleo e biomassa.....	81
4.15.1. Estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo.....	81
4.16. Caracterização da biomassa seca (Análise imediata)	81
4.16.1. Teor de umidade.....	84
4.16.2. Teor de voláteis.....	84
4.16.3. Cinzas.....	85
4.16.4. Carbono fixo.....	85
4.17. Análise Elementar (AE).....	85
4.18. Análise Termogravimétrica (TGA).....	86
4.19. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	87
4.20. Produção de ésteres utilizando a reação <i>in situ</i>	87
5. RESULTADOS	89
5. 1 – Testes preliminares.....	89
5. 1.1 - Geração de biomassa a partir do crescimento celular.....	89
5.1.2 - Comportamento da microalga <i>Chlorella</i> sp. e uma espécie de cianobactéria <i>Oscillatoria</i> sp. em um sistema de co-cultura em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo.....	92
5.2. Geração de biomassa a partir do crescimento celular.....	93
5.3. Impacto no pH do meio de cultivo.....	97
5.4. Análise microscópica das co-culturas.....	97
5.4.1. Identificação da co-cultura.....	97
5.4.2. Microscópio de luz.....	99
5.4.3. Estereomicroscópio.....	102
5.5. Comportamento da co-cultura em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo.....	107
5.6. Comportamento da co-cultura em relação ao teor e rendimento de biomassa.....	114
5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	118

5.8. Reprodutibilidade dos experimentos.....	123
5.8.1. Reprodutibilidade dos experimentos visando quantidade de óleo e teor lipídico.....	123
5.8.2. Reprodutibilidade dos experimentos visando quantidade de biomassa.....	125
5.9. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias com adição de vitaminas.....	125
5.9.1. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias com adição de vitaminas visando quantidade de óleo e teor lipídico.....	126
5.9.2. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias com adição de vitaminas visando rendimento de biomassa.....	128
5.10. Análise imediata.....	130
5.11. Análise elementar.....	132
5.12. Análise termogravimétrica (TGA).....	137
5.13. Espectroscopia na região do infravermelho.....	140
6. CONCLUSÃO.....	145
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	146
REFERÊNCIAS.....	147

INTRODUÇÃO

Atualmente, mais de 80% das necessidades energéticas globais são atendidas por combustíveis fósseis, como petróleo, carvão e gás natural, acarretando desafios ambientais e de saúde (Aghbashlo *et al.*, 2021). Ao longo da história, a humanidade viu seu desenvolvimento vinculado a diferentes formas de energia, como lenha, carvão mineral e máquinas térmicas durante as Revoluções Industriais, resultando em crescente dependência de combustíveis fósseis e impactos ambientais (Silva, 2022d; Guerra, 2019).

Duarte *et al.* (2022) destacam a distinção entre fontes de energia renováveis e não renováveis, sendo as últimas, como combustíveis fósseis e energia nuclear, consideradas limitadas e de regeneração lenta. Em contraste, fontes renováveis, como solar, eólica, hídrica e de biomassa, oferecem alternativas sustentáveis e abundantes.

Nesse contexto, o cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis tem ganhado destaque, pois, por meio da fotossíntese, as microalgas podem converter água, CO₂ e luz solar em biomassa, utilizada na fabricação de biocombustíveis (Zhu *et al.*, 2019).

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares com uma composição bioquímica diversificada, tornando-as uma opção ideal para a produção de biocombustíveis em comparação com plantas superiores (Cardoso *et al.*, 2020). Além disso, essas microalgas são fotossintetizantes, apresentam uma taxa de crescimento elevada, não requerem solo arável para o desenvolvimento e, portanto, não competem com os alimentos. Adicionalmente, essas microalgas podem ser encontradas tanto em água doce quanto em água salobra, o que significa que não dependem exclusivamente de água doce para o seu crescimento (Touliabah *et al.*, 2022).

As microalgas desempenham um papel crucial na fixação do dióxido de carbono (CO₂) atmosférico, utilizando-o eficientemente durante o processo de fotossíntese. Enquanto as plantas e árvores terrestres conseguem fixar apenas de 3 a 6% desse gás associado ao aquecimento global, as microalgas realizam esse processo de forma extraordinariamente rápida, entre 10 a 50 vezes mais rápido em média. Esses microrganismos, portanto, surgem como uma ferramenta eficaz na mitigação do CO₂, um gás altamente prejudicial amplamente liberado durante a queima de combustíveis fósseis. A conversão das microalgas em biodiesel apresenta potencial rentabilidade para as indústrias, uma vez que o cultivo desses organismos oferece vantagens significativas em comparação com outras culturas energéticas (De Paula, Chagas & Mendonça, 2023).

Este trabalho propõe o cultivo de *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp. em sistema de co-cultura, visando a produção de lipídeos, biomassa, biodiesel in situ e biochar. A intenção é explorar diferentes condições de cultivo, como nutrientes, reatores, tempo, luminosidade e aeração, para otimizar a produção e reduzir a dependência de combustíveis fósseis.

A expectativa é que a co-cultura sob diferentes condições proporcione interações mutualísticas, aumentando o metabolismo de lipídeos e biomassa. Testar variáveis como nutrientes, reatores, tempo de cultivo, luminosidade e aeração permitirá analisar, comparar e otimizar as melhores condições de cultivo para a produção de diversos produtos relacionados a biocombustíveis. Este estudo busca contribuir para a busca de alternativas sustentáveis e eficientes no cenário energético global.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Aprimorar as condições de cultivo de microalgas e cianobactérias em co-cultura e caracterizar a biomassa e o óleo gerados para avaliar seu potencial na produção de biodiesel *in situ* e biochar.

2.2. Objetivos específicos

- Cultivar uma espécie de microalga *Chlorella* sp. e uma espécie de cianobactéria *Oscillatoria* sp. em um sistema de co-cultura para avaliar suas capacidades biotecnológicas para a área de biocombustíveis;
- Avaliar o crescimento da microalga *Chlorella* sp. e da cianobactéria *Oscillatoria* sp. em um sistema de co-cultura e comparar com outras espécies de microalgas e cianobactérias;
- Verificar se a co-cultura composta pela microalga *Chlorella* sp. e da cianobactéria *Oscillatoria* sp. são capazes de sintetizar uma maior quantidade de biomassa e lipídeos que as espécies em mono-culturas;
- Realizar microscopias e estereomicroscopias para examinar, classificar e fotografar materiais biológicos em diferentes estágios do processo;
- Desenvolver um planejamento estatístico para otimizar o rendimento e a produção de lipídeos e biomassa, controlando os fatores selecionados;
- Caracterizar o óleo e a biomassa produzido pela microalga *Chlorella* sp. e cianobactéria *Oscillatoria* sp. em um sistema de co-cultura, para verificar as potencialidades de produção de biodiesel *in situ* e biochar.
- Realizar testes analíticos relacionados à biomassa seca, lipídeos e biodiesel *in situ* produzido pela microalga *Chlorella* sp. e cianobactéria *Oscillatoria* sp. em um sistema de co-cultura;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Combustíveis fósseis X Biocombustíveis

Os combustíveis fósseis desempenham um papel vital na sociedade, sendo fontes não renováveis de energia de extrema importância e ocupando uma significativa parcela na matriz energética global (Silva *et al.*, 2022d).

No cenário atual, os pesquisadores expressam preocupações ambientais diante de diversos fatores, sendo um deles a considerável quantidade de combustíveis fósseis consumidos para suprir as demandas energéticas. Esse consumo excessivo contribui para problemas ambientais significativos (Guerra *et al.*, 2022).

Atualmente, vem aumentando a preocupação dos pesquisadores diante dos impactos ambientais vinculados ao consumo desenfreado de combustíveis fósseis. A combustão desses recursos não renováveis resulta na emissão substancial de gases de efeito estufa na atmosfera, especialmente dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O). Esses gases desempenham um papel crucial no aquecimento global e nas transformações climáticas observadas globalmente (De Paula, Chagas & Mendonça, 2023).

O contínuo aumento das emissões de gases de efeito estufa oriundas do uso de combustíveis fósseis tem desencadeado uma série de consequências negativas. Essas incluem o derretimento acelerado das calotas polares, o aumento do nível do mar, a intensificação de fenômenos climáticos extremos, como furacões, secas e enchentes, e a modificação dos padrões climáticos sazonais. Esses eventos extremos exercem impactos diretos sobre comunidades, economias e ecossistemas, colocando em risco a segurança alimentar, a biodiversidade e a qualidade de vida em geral (De Paula, Chagas & Mendonça, 2023).

Para além das repercussões do aquecimento global, a exploração e extração de combustíveis fósseis acarretam também danos ambientais em nível local. As atividades de mineração e perfuração podem resultar em desmatamento, degradação do solo e contaminação da água e do ar. Vazamentos de petróleo e incidentes acidentais representam um risco constante em plataformas offshore e oleodutos, provocando uma poluição marinha devastadora e impactando negativamente a fauna marinha e as comunidades costeiras (Silva *et al.*, 2022d).

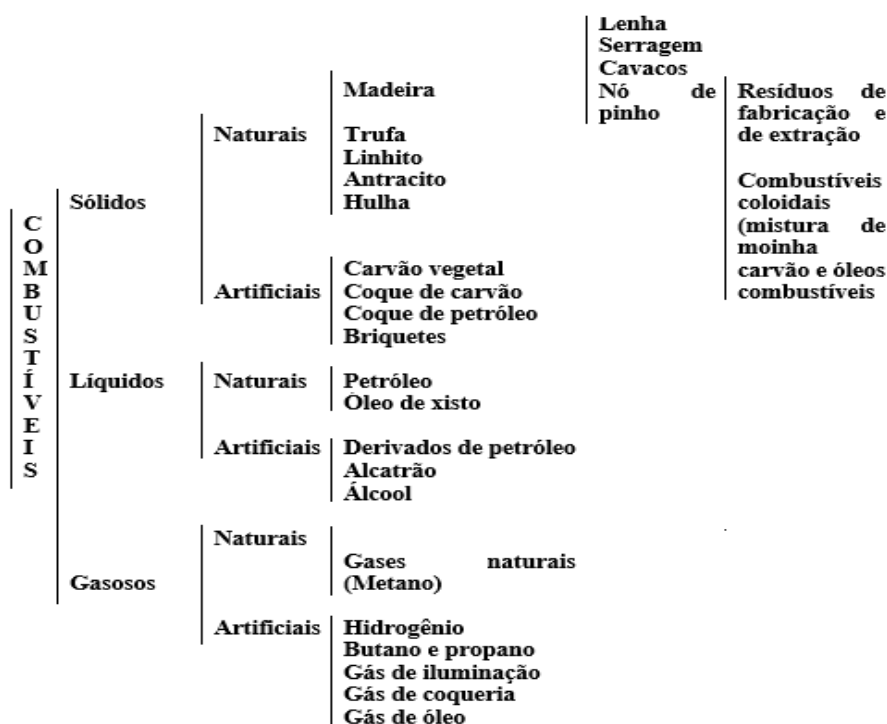
Para enfrentar os desafios ambientais, muitos países estão trabalhando para reduzir sua dependência de combustíveis fósseis, fomentando a transição para fontes de energia mais

limpas e renováveis, como solar, eólica, hidrelétrica e geotérmica. Essa mudança não apenas contribuirá para a atenuação dos impactos ambientais, mas também abrirá portas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, a geração de empregos verdes e a construção de uma economia de baixo carbono (Guerra, 2019).

Entretanto, a transição energética se depara com desafios consideráveis, incluindo a necessidade de investimentos em infraestrutura, o aprimoramento de tecnologias mais eficientes e a superação de interesses econômicos profundamente enraizados na indústria de combustíveis fósseis. Adicionalmente, várias regiões do mundo ainda mantêm uma forte dependência dos combustíveis fósseis para suprir suas necessidades energéticas, tornando a transição um processo complexo e gradual (Silva *et al.*, 2022d).

Na Figura 1, Silva *et al.* (2022) ilustra as variações entre os diversos tipos de combustíveis, classificando-os com base na fase e no método de obtenção. Isso proporciona uma visão abrangente das diferentes matérias-primas disponíveis e suas respectivas aplicações.

Figura 1 - Classificação dos combustíveis segundo a fase e modelo de aplicação.

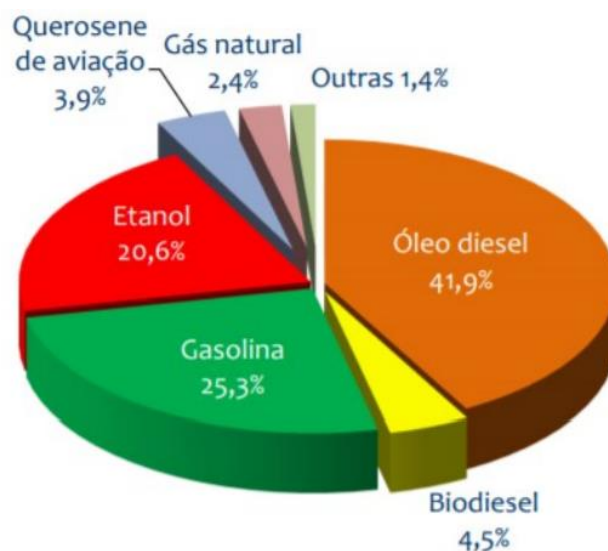


Fonte: Silva et al. (2022).

Barbieri (2021) destaca, na Figura 2, o consumo de energia no setor de transportes em 2019, evidenciando que os combustíveis desempenham um papel predominante nesse

consumo. Entre os biocombustíveis, o etanol representa 20%, enquanto o biodiesel corresponde a 5%. Esses dados indicam o considerável potencial do Brasil para a produção de biocombustíveis, ressaltando a viabilidade do uso generalizado de fontes renováveis de energia.

Figura 2 - Consumo de energia nos transportes em 2019.

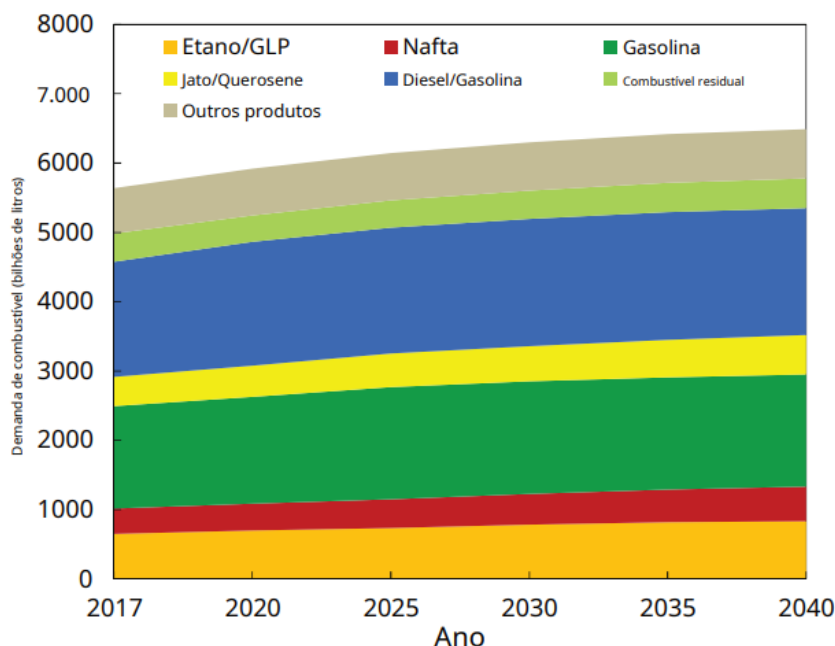


Fonte: Barbieri (2021).

A busca por fontes renováveis de energia destinadas à produção de biocombustíveis está em constante crescimento global. Essa crescente demanda da sociedade é motivada principalmente por preocupações ambientais relacionadas às emissões de gases provenientes da queima de combustíveis fósseis. Diante da necessidade de suprir a demanda por combustíveis não renováveis, como o petróleo, torna-se importante a descoberta e utilização de fontes alternativas que sejam tanto renováveis quanto sustentáveis (Silva *et al.*, 2019).

A maior parte dos gases prejudiciais ao meio ambiente e à saúde tem origem na queima de combustíveis fósseis, como o carvão mineral e o petróleo. Um exemplo desse tipo de combustível é o diesel, frequentemente escolhido devido à sua eficiência termodinâmica e econômica. A Figura 3 ilustra as perspectivas globais relacionadas aos produtos derivados de fontes fósseis (Aghbashlo *et al.*, 2021).

Figura 3 - Perspectivas globais de demanda de produtos refinados de 2017 a 2040.



Fonte: Aghbashlo et al. (2021).

Um dos problemas relacionados aos combustíveis fósseis é a finitude de suas reservas e os problemas ambientais associados às áreas de extração. Esse contexto ressalta a necessidade de incentivar o uso de combustíveis renováveis para mitigar os impactos ambientais decorrentes do consumo desenfreado de combustíveis fósseis (Maciel, 2018).

Diante desse cenário, os biocombustíveis surgem como uma perspectiva promissora para a produção de energia e a redução da dependência de combustíveis fósseis. A produção de biocombustíveis utiliza fontes renováveis, como biomassa de diversas plantas, gerando diferentes tipos de biocombustíveis (Duarte *et al.*, 2022).

O uso de biocombustíveis no Brasil teve início nos anos 1900 com a mistura de etanol e gasolina, tornando-se obrigatório por lei em 1931 pelo Decreto nº 19.717. Posteriormente, o Governo Federal estabeleceu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, incentivando a produção de álcool, expansão da indústria, geração de empregos e aumento da demanda por esse combustível renovável no país (Barbieri, 2021).

A promoção de leis que incentivem o uso de diferentes combustíveis e biocombustíveis é crucial, dada a importância vital da energia na qualidade de vida, saúde, indústria e uso doméstico (Duarte *et al.*, 2022).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) em 2020, as regiões Sudeste e Centro-Oeste lideraram com mais de 400 instalações produtoras de biodiesel e etanol no Brasil, indicando que os biocombustíveis estão ganhando espaço na matriz energética do país. O incremento e estímulo ao uso desses biocombustíveis foram impulsionados em 2019 pela Política Nacional dos Biocombustíveis (RenovaBio), que entrou em vigor por meio da Lei nº 13.576/2017, promovendo o aumento da produção desses combustíveis no Brasil.

O Governo Federal, juntamente com o RenovaBio e o Proálcool, promove a participação ativa no uso de biocombustíveis, visando substituir os combustíveis fósseis, adotando a ideia de biorrefinaria. A Figura 4 apresenta o desenvolvimento dos combustíveis renováveis no Brasil de 2010 a 2019 (Barbieri, 2021).

Figura 4 - Participação de biocombustíveis nos transportes no Brasil de 2010 a 2019.



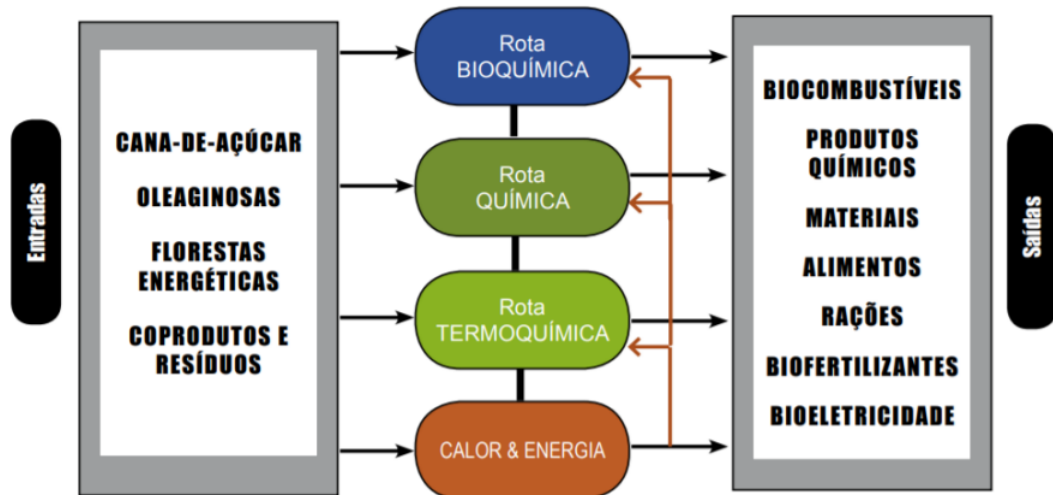
Fonte: Barbieri (2021).

As biorrefinarias representam instalações físicas capazes de empregar uma variedade de biomassa orgânica na geração de bioenergia. Essas instalações têm a capacidade de extrair materiais para diversos fins, incluindo alimentação humana e animal, biofertilizantes, produtos químicos e a produção de vários tipos de biocombustíveis (Santos, Ruzene, Silva, 2017).

Essa realidade enfatiza a importância das biorrefinarias, uma vez que têm a versatilidade de lidar com diversos tipos de biomassa orgânica, empregando diferentes rotas para a conversão e produção de produtos com alto valor agregado. A Figura 5 destaca as principais matérias-primas, rotas (biológicas, químicas e físicas) e produtos resultantes das

biorrefinarias no Brasil. Vale destacar que as biorrefinarias têm um objetivo claro em relação à utilização das culturas orgânicas, visando aproveitar integralmente esse material (Barbieri, 2021).

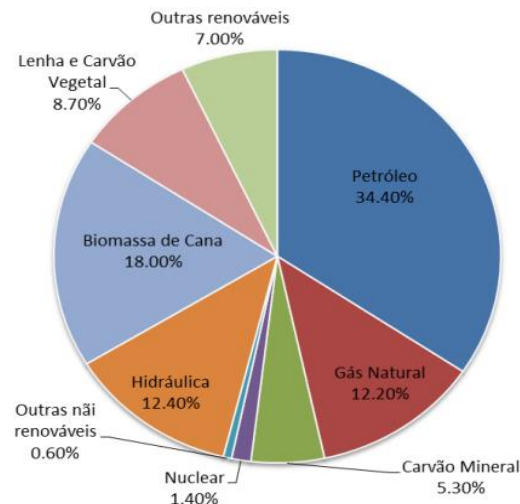
Figura 5 - Conceito de biorrefinarias no Brasil.



Fonte: Barbieri (2021).

Recentemente, o conceito de biorrefinaria tem ganhado destaque, impulsionado pelo apoio do Governo Federal. No entanto, ainda há desafios a serem superados, uma vez que a matriz energética brasileira mantém uma significativa dependência dos combustíveis fósseis. Em 2019, o petróleo, o gás mineral e o carvão representavam coletivamente cerca de 50% da matriz energética no Brasil, conforme ilustrado na Figura 6 (Duarte et al., 2022).

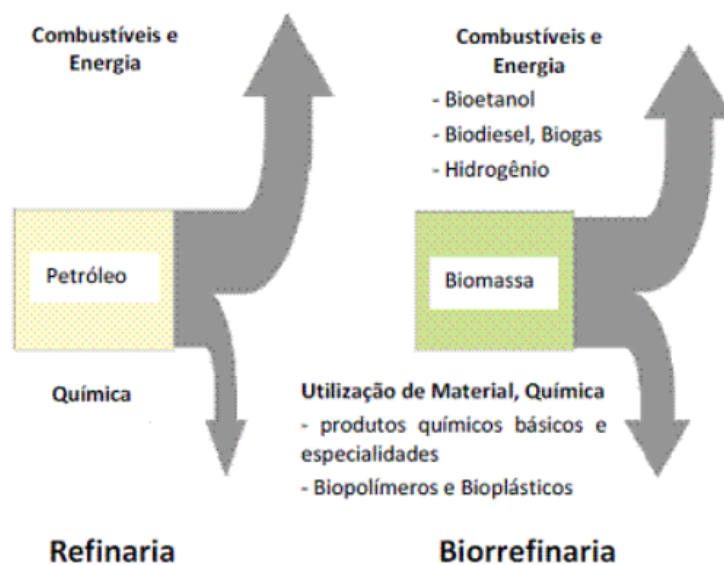
Figura 6 - Matriz energética brasileira em 2019.



Fonte: Duarte (2022).

Os biocombustíveis são aqueles que são capazes de ter uma produção vertical relacionada a produtos químicos, derivados e energia produzida, quando comparada ao petróleo sua versatilidade é muito maior bem como sua relação com o meio ambiente, como mostra a Figura 7 (Neves & Harder, 2021).

Figura 7 - Refinaria de petróleo versus biorrefinaria.



Fonte: Neves & Harder (2021).

Os biocombustíveis emergem como uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis, como o petróleo, devido à sua produção vertical e benefícios ambientais. Ao contrário do petróleo, que envolve processos complexos de extração, refino e distribuição, os biocombustíveis podem ser derivados de fontes renováveis, como biomassa vegetal e resíduos orgânicos. Essa abordagem permite uma produção contínua e sustentável, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa e reduzindo a dependência de recursos não renováveis (De Paula, Chagas & Mendonça, 2023).

A notável versatilidade dos biocombustíveis permite sua aplicação em diversas áreas, desde a produção de energia elétrica até o abastecimento de veículos. Por exemplo, o etanol desempenha um papel significativo como aditivo na gasolina, elevando a eficiência dos motores e reduzindo as emissões poluentes. Por sua vez, o biodiesel atua como substituto do diesel de origem fóssil, desempenhando um papel crucial na diminuição da poluição atmosférica (Oliveira, 2019).

Outro benefício dos biocombustíveis está em sua influência positiva sobre o meio ambiente. Durante o ciclo de crescimento das plantas ou culturas destinadas à produção

desses combustíveis, há a absorção de dióxido de carbono (CO_2) da atmosfera, auxiliando na diminuição do efeito estufa e do aquecimento global. Além disso, o uso desses biocombustíveis geralmente resulta em emissões mais baixas de dióxido de enxofre (SO_2), óxidos de nitrogênio (NO_x) e material particulado quando comparado aos combustíveis fósseis, o que contribui para a melhoria da qualidade do ar e a redução dos impactos adversos na saúde humana (De Paula, Chagas & Mendonça, 2023).

Apesar de todas essas vantagens, é crucial destacar que a produção e o uso de biocombustíveis também enfrentam desafios e considerações críticas, como a necessidade de terras disponíveis para o cultivo das matérias-primas, o equilíbrio energético envolvido em sua produção e as implicações socioeconômicas relacionadas à agricultura. Contudo, com o progresso contínuo da tecnologia e a implementação de práticas sustentáveis, os biocombustíveis têm o potencial de desempenhar um papel crucial na transição para um futuro energético mais limpo e ambientalmente responsável (Neves & Harder, 2021)

3.2. Biodiesel

O biodiesel é categorizado como um biocombustível composto por ésteres monoalquílicos de ácidos graxos, sendo obtido a partir de diversas fontes de lipídeos, como óleos vegetais e gorduras animais. A reação química para a produção desse biocombustível ocorre por meio da interação com etanol ou metanol, utilizando um catalisador ácido ou básico. Ele pode ser empregado em motores do tipo diesel, seja de maneira pura ou em combinação com o diesel convencional (Demirbas, 2007).

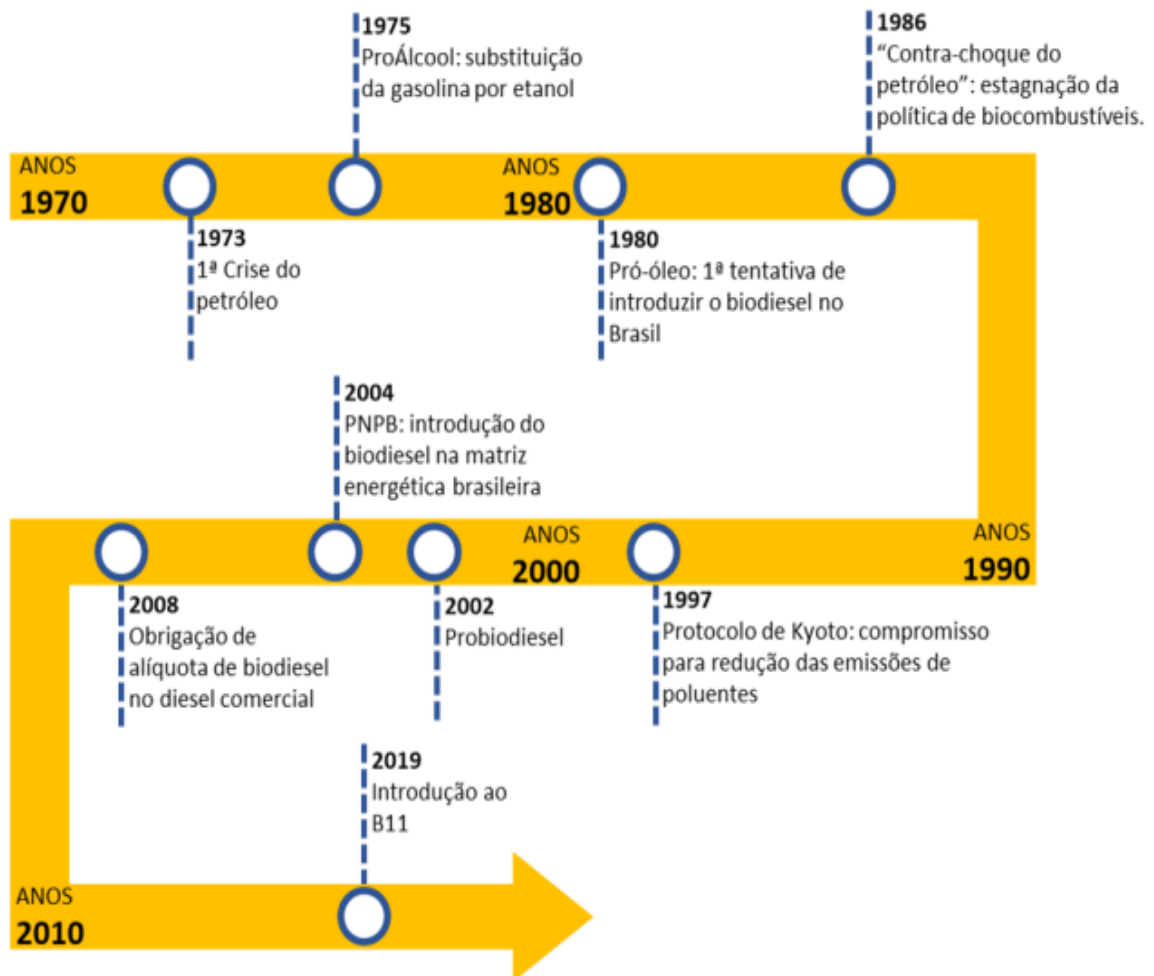
A popularização do biodiesel no Brasil teve início a partir de 2004, coincidindo com o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). Isso desencadeou aprimoramentos, novas pesquisas e a incorporação do biodiesel à matriz energética nacional, conforme evidenciado na Figura 8 (Vidigal, 2020).

Desde a implementação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em 2004, o biodiesel tem conquistado crescente relevância na matriz energética do Brasil. Esse programa representou um marco significativo no cenário energético do país, promovendo a produção e adoção de biocombustíveis como uma alternativa mais sustentável e ecologicamente amigável em relação aos combustíveis fósseis convencionais (França, 2023).

Além das vantagens ambientais decorrentes da diminuição das emissões de gases de efeito estufa e poluentes, a utilização do biodiesel também resultou em impactos

socioeconômicos positivos. O estímulo à produção agrícola de culturas oleaginosas, como soja, girassol, mamona e outras, que servem como matérias-primas para a produção de biodiesel, impulsionou o desenvolvimento do agronegócio em várias regiões do país. Isso resultou na criação de empregos, aumento da renda para os agricultores e fortalecimento da economia local (Castro, 2023).

Figura 8 - Histórico do desenvolvimento do biodiesel no Brasil.



Fonte: Vidigal (2020).

Diante da crescente necessidade mundial por fontes de energia limpa e renovável, o Brasil emergiu como um líder na produção e utilização de biodiesel, proporcionando oportunidades para a expansão no mercado internacional. A indústria brasileira de biodiesel, ao longo do tempo, passou por avanços tecnológicos e aprimoramentos de eficiência, conferindo ao produto nacional competitividade no cenário global (França, 2023).

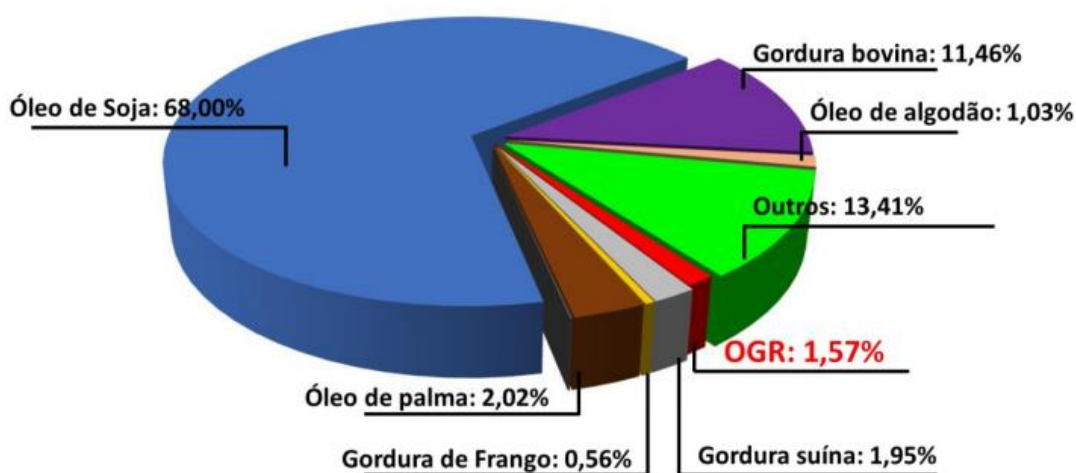
Entretanto, é essencial ressaltar que o progresso constante no setor de biodiesel confrontou desafios, como a imperativa expansão da infraestrutura logística para o transporte

e distribuição eficientes do biocombustível em todo o território nacional. Adicionalmente, o aumento na produção de matérias-primas suscita questões ambientais e sociais, incluindo considerações sobre o uso de terras agrícolas e a preservação de áreas naturais (Trentin, 2023).

O lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel representou um ponto de virada na trajetória do biodiesel no Brasil, impulsionando sua disseminação e consolidação como um componente vital na matriz energética do país. O comprometimento nacional incluiu contínuos investimentos em pesquisa, desenvolvimento e políticas públicas, visando garantir a sustentabilidade e expansão do setor. Esse esforço concentrou-se em aprimorar as características técnicas e a eficiência da produção, bem como em diversificar as matérias-primas utilizadas. Dessa forma, o Brasil busca ativamente a transição para uma economia de baixo carbono e mais comprometida com a responsabilidade ambiental (Silva, 2017).

A partir da popularização e incentivo ao uso do biodiesel, novas matérias primas (plantas oleaginosas) começaram a ser utilizadas, para obter novas possibilidades de produção e custos de produção (Figura 9). O seu custo de produção vai estar relacionado justamente com a matéria prima utilizada. Os vegetais que são considerados mais limpos para produção de biodiesel, são aqueles que não são comestíveis e juntamente com a utilização do etanol, por ser um combustível renovável (Guedes, Santos, Santos, 2020).

Figura 9 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil.



Fonte: Vidigal (2020).

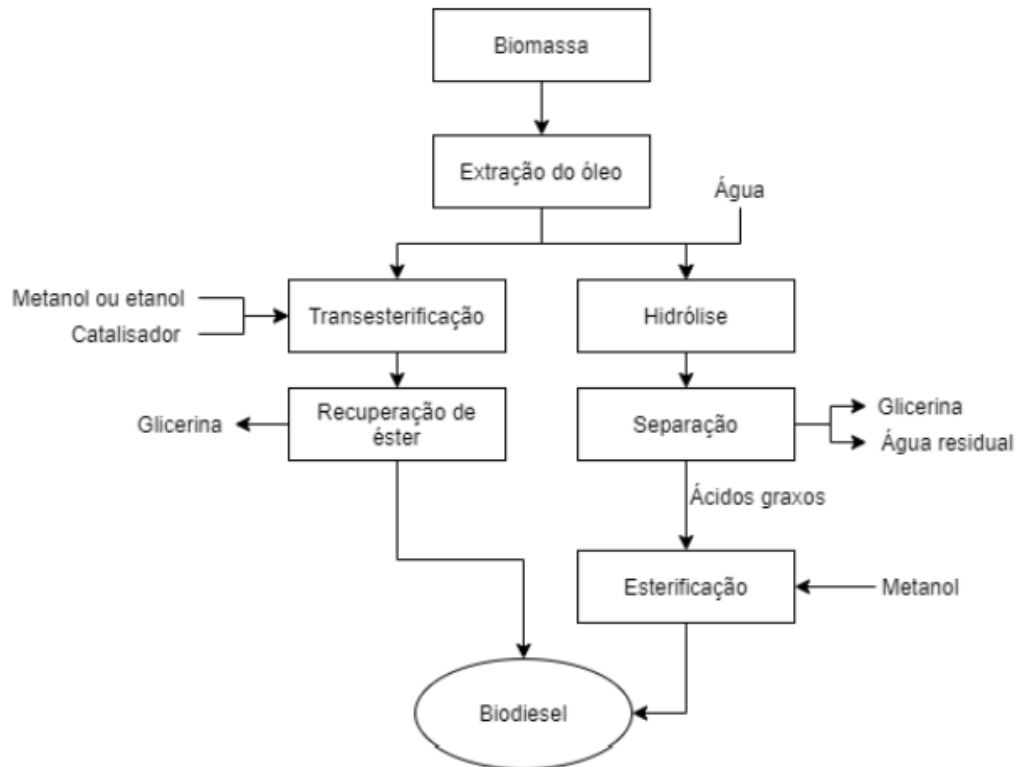
As principais matérias-primas para a produção de biodiesel são os óleos vegetais e as gorduras animais. Contudo, a maior viscosidade de certos tipos de gorduras ou óleos pode

apresentar desafios quando aplicados em motores a diesel. Pesquisas em curso em várias partes do mundo buscam aprimorar a qualidade do biodiesel em diferentes aspectos, visando sua maior aceitação no mercado (Aghbashlo *et al.*, 2021).

O biodiesel pode ser empregado como substituto ou em mistura com o diesel fóssil, minimizando assim os impactos ambientais. As reações químicas, realizadas pelo método de transesterificação na presença de um catalisador homogêneo ou heterogêneo, envolvem a interação dos lipídeos com um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol), na presença de um catalisador (ácido ou básico, homogêneo ou heterogêneo), resultando na produção de uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol. Diversos fatores, como temperatura, pressão, tempo, concentração, tipo de catalisador, razões molares de álcool para óleo e tipo de matéria-prima, podem afetar o resultado final, conforme ilustrado na Figura 10, que apresenta as rotas básicas para a produção de biodiesel (Guedes, Santos e Santos, 2020).

Outra abordagem para a produção de biodiesel é a esterificação, geralmente utilizada quando a matéria-prima apresenta alta acidez, podendo incluir borras de refino e óleo de fritura. A hidroesterificação, que envolve a hidrólise seguida da reação de esterificação, também pode ser parte desse processo (Carvalho, 2022).

Figura 10 - Rotas para produção de biodiesel.



Fonte: Carvalho (2022).

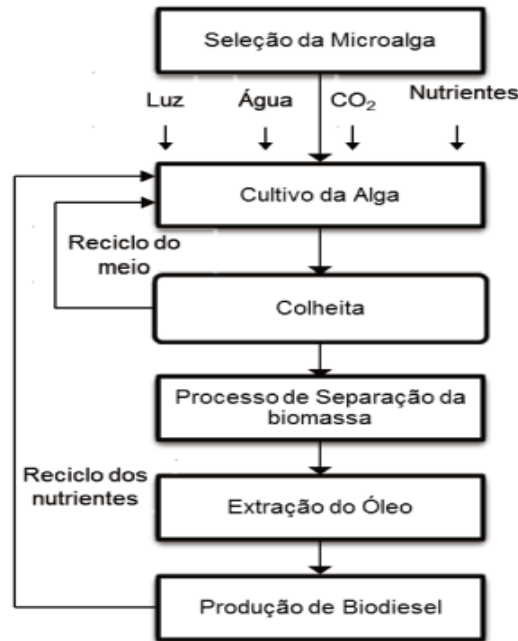
Uma opção inovadora e relevante é a fabricação de biodiesel a partir de microrganismos fotossintéticos, sendo as microalgas particularmente notáveis devido ao seu vasto potencial biotecnológico. As microalgas representam uma alternativa verde e renovável, introduzindo uma nova perspectiva na área de bioenergia. Esses microrganismos têm a capacidade de acumular elevados teores de lipídios, proteínas, hidrocarbonetos e polissacarídeos, tornando-os aptos para a produção de diversos tipos de biocombustíveis (Oliveira *et al.*, 2022).

Chiesa (2019), apresenta uma lista de vantagem do uso de microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel, são elas:

- Não competem com os alimentos;
- Não requerem terras agricultáveis para seu cultivo;
- Podem ser cultivadas em regiões desérticas ou em solos degradados;
- Crescem em águas residuais, onde essas águas podem ser reutilizadas durante novos processos;
- Podem cultivadas em qualquer época do ano;
- Tem uma alta produtividade de biomassa e lipídeos (dependendo da espécie);
- Não requerem aplicação de agrotóxicos;
- Podem obter nutrientes a partir de águas residuais.

Pinto (2014), apresenta as etapas e preparação para produção de biodiesel a partir de microalgas (Figura 11).

Figura 11 - Etapas e preparação da microalga para produção de biodiesel.



Fonte: Pinto (2014).

3.3. Biochar

O termo "biochar" ou "biocarvão" originou-se da combinação das palavras "biomassa" e "carvão". O biochar é um material rico em carbono obtido a partir de uma matéria-prima (biomassa) que passou pelo processo de pirólise (conforme ilustrado na Figura 12). O método de produção de biochar é semelhante ao utilizado na fabricação de carvão vegetal; no entanto, o biochar foi desenvolvido com foco em aplicações de remediação do solo (Kalinke, 2019).

Esses materiais carbonosos foram historicamente empregados na região amazônica, onde ficaram conhecidos como "Terras Pretas de Índio", caracterizadas por sua coloração escura e elevada fertilidade (Kalinke, 2019). Uma aplicação em larga escala remonta à Primeira Guerra Mundial, quando o biochar foi utilizado devido às suas propriedades de adsorção de micro e macromoléculas (Schultz, 2012).

Figura 12 - Esquema de obtenção e aplicação de biochar a partir de biomassa.



Fonte: Kalinke (2019).

Para além de suas aplicações históricas, o biochar está cada vez mais ganhando destaque devido às suas propriedades benéficas para o solo e o meio ambiente. Ao ser incorporado ao solo, o biochar pode aprimorar suas características físicas, químicas e biológicas, criando um ambiente mais propício para o crescimento das plantas. Sua estrutura porosa e elevada capacidade de retenção de água contribuem para a diminuição da lixiviação de nutrientes, resultando em uma maior eficiência na utilização de fertilizantes e, por conseguinte, na redução dos impactos ambientais associados ao uso excessivo destes (Tenório, 2017).

Outro elemento fundamental do biochar é sua habilidade de capturar carbono por extensos períodos. Dado que o biochar é altamente resistente à decomposição, o carbono retido durante o processo de pirólise permanece, essencialmente, armazenado no solo por centenas ou até milhares de anos. Isso desempenha um papel crucial na mitigação das mudanças climáticas ao diminuir a concentração de dióxido de carbono na atmosfera (Kalinke, 2019).

Para além de suas utilizações no âmbito agrícola e ambiental, o biochar tem sido objeto de exploração em várias outras esferas, incluindo a remediação de áreas contaminadas, a fabricação de materiais de construção sustentáveis e até mesmo seu emprego como componente em tecnologias avançadas, como eletrodos para dispositivos eletroquímicos (Moraes, 2021).

Contudo, apesar de todos os benefícios potenciais do biochar, sua produção e aplicação demandam monitoramento cuidadoso. A seleção da matéria-prima, o processo de pirólise e a aplicação no solo são elementos críticos que podem ter impactos significativos nos

resultados e nas consequências ambientais. A pesquisa contínua é crucial para uma compreensão abrangente dos efeitos do biochar em diversos contextos, assegurando sua utilização sustentável e maximizando seus benefícios positivos (Silva, 2023).

O biochar exibe características de grande relevância em diversas áreas da indústria e do meio ambiente, desempenhando papéis fundamentais na melhoria do solo, na gestão de resíduos e na mitigação das mudanças climáticas. Sua aplicação ambiental é particularmente benéfica, pois pode ser empregado como biofertilizante, biocombustível e para a redução da biodisponibilidade de contaminantes, resultando na diminuição da toxicidade do solo (Carvalho, 2022).

As características do biochar podem variar consideravelmente com base na matéria-prima de origem (conforme ilustrado na Figura 13). Esses materiais podem exibir propriedades distintas, como adsorção e biofertilização, influenciando a interação do material. Portanto, a escolha adequada da matéria-prima do biochar é crucial, dependendo da aplicação desejada (Kalinke, 2019).

Figura 13 - Exemplo de produção de biocarvão a partir do bagaço de laranja em um processo de carbonização por 55 minutos.



Fonte: Carvalho (2022).

Atualmente, diversas pesquisas estão em andamento no campo do biochar e sua termoconversão, incluindo a carbonização hidrotérmica (HTC). Esta abordagem requer menos pré-tratamento em comparação com processos convencionais, como a pirólise (Carvalho, 2022). A Tabela 1 apresenta um resumo do processo de conversão termoquímica, detalhando o produto principal, o método e o aumento de temperatura associados.

A conversão termoquímica envolve a decomposição de componentes orgânicos da biomassa, resultando em produtos sólidos, líquidos e gasosos. Os produtos, seus rendimentos

e as suas respectivas composições são diretamente influenciados pela biomassa, pela técnica e pelas condições de processo. De forma geral, a Tabela 1 sumariza os processos de termoconversão (Schultz, 2012).

Tabela 1 - Processo de conversão termoquímica.

	Processo			Aumento de temperatura
	-	Seco	Úmido	↑
Produto principal	Gás	Gaseificação	Gaseificação hidrotérmica	
	Líquido	Pirólise rápida	Liquefação hidrotérmica	
	Sólido	Pirólise lenta (carbonização) e Torrefação	Carbonização hidrotérmica	

Fonte: Carvalho (2022).

Devido às suas características notavelmente vantajosas, o biochar tem despertado considerável interesse em várias esferas, abrangendo desde a indústria até a gestão ambiental. Sua habilidade para aprimorar o solo, gerenciar resíduos e mitigar as mudanças climáticas o posiciona como uma ferramenta promissora para enfrentar os desafios ambientais contemporâneos (Kalinke, 2019).

Uma característica significativa do biochar é sua capacidade adsorvente, implicando que pode adsorver e reter substâncias químicas e contaminantes presentes no solo. Isso resulta na redução da toxicidade e da disponibilidade dessas substâncias para os seres vivos, incluindo plantas e microrganismos (Frasca, 2023).

É crucial ressaltar que as propriedades do biochar podem variar consideravelmente, dependendo da matéria-prima utilizada em sua produção. Distintas matérias-primas podem resultar em biochars com características adsorptivas e biofertilizantes específicas. Assim, a escolha apropriada da matéria-prima é de suma importância, já que ela pode influenciar diretamente a capacidade de interação do biochar com o ambiente e sua eficácia em diversas aplicações (Prochnow, 2023).

Matérias-primas como resíduos industriais, rejeitos agrícolas, cascas de amendoins, madeira, serragem, palhas de trigo ou milho, resíduos de mamona entre outras podem ser

utilizadas para produção de biochar, dessa forma este tipo de material tem um grande apelo ambiental, diversas aplicações e grande diversidade de matérias-primas (Kalinke, 2019).

Vieira (2021), apresenta as características físico-químicas podem variar de acordo com a matéria-prima utilizada e as condições do processo de pirólise, mas geralmente apresenta algumas propriedades comuns. Abaixo estão algumas das principais características físico-químicas do biochar:

- **Elevado teor de carbono:** o biochar é composto principalmente de carbono, com teores que podem variar de 50% a 90% ou mais, dependendo do processo de produção;
- **Superfície porosa:** essa porosidade proporciona uma grande área superficial, o que pode contribuir para suas propriedades físicas;
- **Estabilidade:** devido à sua natureza carbonácea, o biochar é relativamente estável e pode persistir no solo por períodos prolongados, o que o torna uma opção interessante para o sequestro de carbono e a melhoria da qualidade do solo;
- **Capacidade de retenção de água:** a estrutura porosa do biochar permite que ele retenha água e nutrientes, podendo contribuir para melhorar a capacidade de retenção de água do solo e, assim, reduzir a necessidade de irrigação em algumas aplicações;
- **Adsorção de nutrientes e compostos orgânicos:** o biochar tem a capacidade de adsorver nutrientes (como nitrogênio, fósforo e potássio) e compostos orgânicos no solo, agindo como um reservatório temporário de nutrientes para as plantas;
- **pH neutro a ligeiramente alcalino:** o biochar geralmente possui um pH próximo a neutro (7) ou ligeiramente alcalino, o que pode ajudar a corrigir a acidez do solo;
- **Baixa densidade aparente:** o biochar costuma ter uma densidade aparente relativamente baixa, o que facilita o manuseio e a incorporação ao solo;
- **Ausência de microrganismos vivos:** devido ao processo de pirólise, o biochar é livre de microrganismos vivos, o que pode ser vantajoso em algumas aplicações, como quando utilizado como substrato para plantas.

Essas são algumas das características físico-químicas mais comuns do biochar. É importante notar que essas propriedades podem variar dependendo do processo de produção e do material de partida utilizado. Além disso, o uso do biochar pode ter diferentes efeitos dependendo da aplicação específica e das condições do solo ou do ambiente em que é utilizado. (Vieira, 2021).

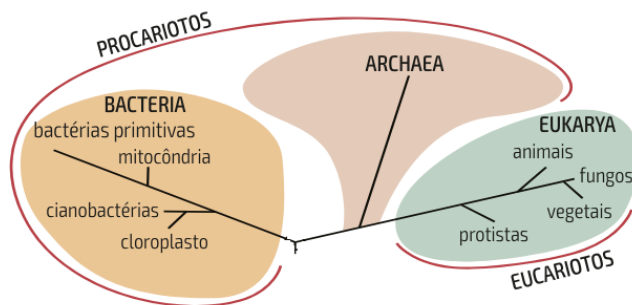
3.4. Microalgas e cianobactérias

Diversos pesquisadores vem a alguns anos tentando categorizar as algas, microalgas e cianobactérias em uma grande variedade de classes. Eles fazem essa classificação de acordo com algumas características como morfologia, pigmentação, ciclo de vida, tipo de reprodução, tecidos verdadeiros e estruturas celulares básicas. Dentre os grupos estudados as microalgas se destacam como o grupo mais apto para a produção de biocombustíveis (Pires, 2017).

O biofísico Carl Woese revolucionou a classificação dos seres vivos ao introduzir uma nova estrutura que os divide em três domínios distintos: Archaea, Bacteria e Eukarya. Por meio da filogenômica e da aplicação de tecnologias moleculares avançadas, os pesquisadores descobriram que as Archaea estão geneticamente mais próximas dos Eukarya do que das bactérias. Essa revelação levou à reavaliação da diversidade dos eucariontes, resultando no abandono da tradicional classificação dos cinco reinos proposta por Robert Whittaker em 1969, e ao lugar, a criação de supergrupos para os eucariontes. Estes supergrupos são agrupamentos que refletem a história evolutiva e os laços de parentesco entre os organismos, proporcionando uma nova visão da biodiversidade (Silva, Nery, 2020).

O domínio Archaea compreende procariontes que anteriormente eram considerados parte do domínio das bactérias (conhecidos como arqueobactérias). Contudo, devido à composição da parede celular e outras características bioquímicas exclusivas desse grupo, eles agora são classificados em um domínio separado. Muitas arqueas são encontrados em ambientes com condições extremas de temperatura, salinidade ou pH, onde outros organismos não sobreviveriam. No domínio Bacteria estão as bactérias, incluindo as cianobactérias. Já no domínio Eukarya estão agrupados organismos como plantas, animais, fungos e aqueles anteriormente classificados como protistas, como mostra a Figura 14. Esse último grupo é subdividido em vários reinos devido à sua falta de monofilismo, ou seja, não inclui todos os descendentes de um único ancestral comum exclusivo (Linhares, Gewandsznajde, Pacca, 2020).

Figura 14 - Divisão dos seres vivos em três domínios



Fonte: (Linhares, Gewandsznajde, Pacca, 2020).

As microalgas, que estão no domínio Eukarya desempenham uma função vital nos ecossistemas marinhos e de água doce. São a base da cadeia alimentar em muitos ambientes aquáticos, oferecendo alimento para uma variedade de organismos, desde pequenos zooplânctons até grandes peixes e mamíferos marinhos. Além disso, as microalgas desempenham um papel essencial na produção de uma quantidade significativa de oxigênio, contribuindo para a regulação dos níveis de gases na atmosfera (Privado, 2021).

Esses organismos apresentam uma notável diversidade, manifestando-se em várias formas e cores. Algumas microalgas possuem a habilidade de movimentação através de estruturas como flagelos ou cílios, ao passo que outras permanecem em suspensão na água, sujeitas às correntes e às condições ambientais (Oliveira, 2019).

As microalgas são microrganismos que medem de 5-50 μm , são fotossintetizantes que utilizam a luz do sol como fonte de energia para realização fotossíntese. Estes microrganismos podem sintetizar alguns produtos de alto valor agregado a partir de seu próprio metabolismo (Yu; Chen; Zhang, 2015).

Esses microrganismos podem ser autotróficos, mixotróficos, fotossintetizantes e que podem viver em diferentes ambientes, predominante em ambientes de água doce ou salgada. As microalgas são conhecidas como uma das mais antigas formas de vida do planeta, que crescem rapidamente em diferentes condições ambientais devido a sua estrutura celular simples e indivíduos bem adaptados (Brennan; Owende, 2010).

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

Este grupo pode ser classificado como procariontes ou eucariontes, de acordo com a sua estrutura celular, organização (uni ou pluricelular) entre outros. Diversas pesquisas

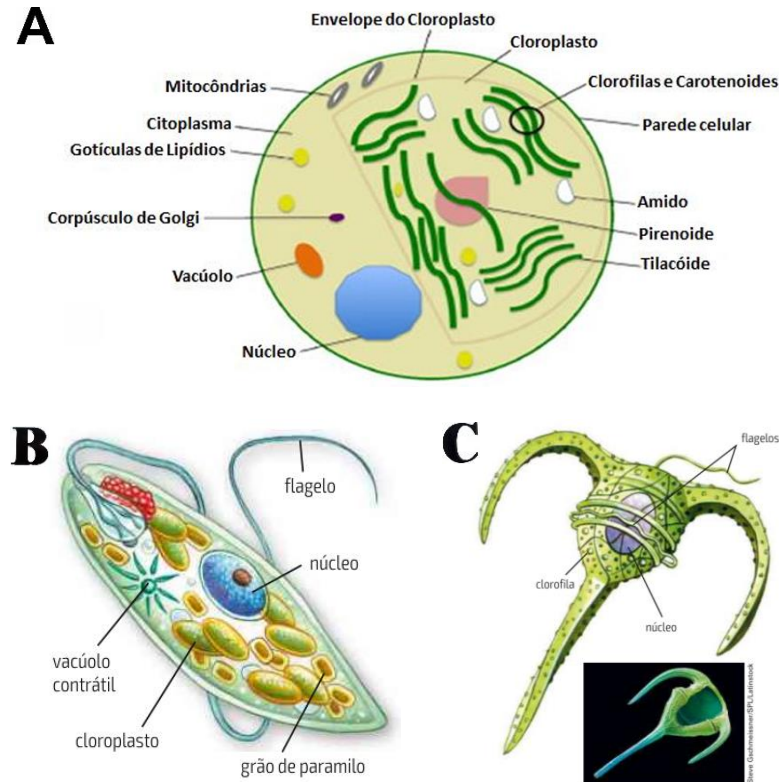
contabilizam a existência de aproximadamente 25.000 espécies descritas de mais de 30.000 existentes. Tendo como representantes de estruturas procariontes as cianobactérias (Cyanophyceae) e de estrutura eucarionte as algas douradas (Chrysophyceae). As cianobactérias, algas douradas, algas verde-azuladas, podem ser classificadas também pelo tipos de pigmentos que elas sintetizam em seu metabolismo (Mathimani *et al.*, 2019).

O grupo das algas verdes, também conhecidas como clorofíceas, se destaca pela coloração verde devido à predominância da clorofila sobre outros pigmentos. Elas contêm clorofilas a e b, pigmentos carotenoides, possuem parede celular de celulose e armazenam amido como reserva energética. Essas algas e microalgas podem assumir diversas formas, desde células unicelulares móveis, com flagelos, até formas imóveis, coloniais ou de vida livre, além de existirem espécies pluricelulares com uma variedade de tamanhos e formas, como mostra a Figura 15. Encontram-se com mais frequência em ambientes marinhos e de água doce, embora algumas espécies possam habitar solos úmidos, troncos, rochas úmidas, neve, gelo e até mesmo o interior de outros organismos ou associadas a fungos, como nos líquens (Linhares, Gewandsznajde, Pacca, 2016).

Pereira *et al.* (2021), apresenta que a classificação das microalgas ocorre com base em sua estrutura celular, características morfológicas, composição bioquímica e filogenia. Esse processo é dinâmico, evoluindo continuamente à medida que novas informações e técnicas de análise genética surgem. As principais abordagens de classificação para microalgas incluem filogenia, estrutura celular, características morfológicas, composição bioquímica e habitat.

É crucial observar que a classificação das microalgas está em constante evolução devido ao avanço contínuo das técnicas de análise genética e ao aumento do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Isso pode levar a revisões ou refinamentos nas classificações existentes (Pereira *et al.*, 2021).

Figura 15 – Esquema básico da organização celular das organelas da microalga *Chlorella vulgaris* (A). Representação esquemática da microalga *Euglena* sp. (B). Representação esquemática da microalga *Ceratium* sp. (C)



Fonte: Adaptado de Cavalcanti (2020) e Linhares, Gewandsznajde, Pacca, 2016.

As microalgas consistem principalmente em carboidratos, lipídios e proteínas, sendo que as proporções de cada componente variam de acordo com a forma de cultivo e a espécie utilizada. A ampla diversidade das microalgas assegura a disponibilidade de diversos produtos de alto valor agregado. A Tabela 2 apresenta várias aplicações das microalgas em diversas áreas, incluindo culturas alimentares (para consumo humano ou animal), como fontes de energia e até mesmo na produção de produtos farmacêuticos (Ferreira, 2021).

Tabela 2 - Espécies de microalgas e seus principais produtos comerciáveis.

Linhagens	Principais produtos
<i>Arthrospira</i> sp.	Proteínas: piscicultura, alimentos dietéticos e saudáveis; Lipídios: especialmente ácidos graxos de alto valor (ácidos linoleico e g-linoleico); Pigmentos (ficocianina, carotenóides).
<i>Botryococcus braunii</i>	Hidrocarbonetos; Pigmentos (violaxantina, luteína).
<i>Chlorella</i> sp.	Proteínas: piscicultura e alimentação de bovinos e suínos e aves.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Proteínas: alimentos dietéticos ou saudáveis, piscicultura e alimentação de bovinos e aves; Empregos cosméticos.
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Lipídeos, especialmente ácidos graxos poli-insaturados de alto valor agregado.
<i>Dunaliella salina</i>	Pigmentos (beta-caroteno; bixina, zeaxantina).
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Pigmentos (astaxantina).
<i>Nannachloropsis oculata</i>	Lipídeos, especialmente ácidos graxos poli-insaturados de alto valor agregado.

Fonte: Assis Neto (2022).

Egea & Marcionilio (2021), relatam que as microalgas constituem organismos microscópicos pertencentes ao grupo de algas eucarióticas unicelulares. Dada a diversidade desse grupo, a composição bioquímica das microalgas pode variar consideravelmente, dependendo da espécie, do ambiente em que vivem, das condições de cultivo, entre outros fatores. Contudo, algumas características bioquímicas comuns são observadas nas microalgas, como:

- **Pigmentos**

- Clorofila: responsável pela fotossíntese, possibilitando a absorção de luz para a produção de energia;

- Carotenoides: pigmentos que auxiliam na captação de luz e protegem as células contra danos causados pela radiação ultravioleta.

- **Carboidratos**

Amido: reserva de carboidratos acumulada em algumas espécies durante a fotossíntese para servir como fonte de energia posteriormente.

- **Proteínas**

Desempenham diversas funções nas microalgas, incluindo a estrutura celular e atuam como

enzimas catalisadoras de reações bioquímicas.

- **Lipídios**

Ácidos graxos: as microalgas podem acumular lipídios, especialmente ácidos graxos, essenciais como fonte de energia, além de terem aplicações industriais na produção de biocombustíveis e outros produtos.

- **Vitaminas e Minerais**

As microalgas também podem ser uma fonte rica de vitaminas (por exemplo, vitamina C, vitamina E) e minerais (por exemplo, ferro, cálcio).

- **Compostos Bioativos**

Algumas microalgas têm a capacidade de produzir compostos bioativos, como antioxidantes, antibióticos, e pigmentos de interesse comercial (por exemplo, ficocianina, utilizada como corante natural).

- **Água**

Composta principalmente por água, como é comum a todos os organismos vivos.

É relevante destacar que as microalgas podem ser direcionadas para diversas finalidades, como alimentos, rações para animais, produtos farmacêuticos, cosméticos, produção de biocombustíveis e tratamento de efluentes, sendo possível adaptar sua composição bioquímica para atender a aplicações específicas. Além disso, as pesquisas em biotecnologia e genômica das microalgas continuam progredindo, proporcionando potenciais descobertas sobre suas propriedades bioquímicas e aplicações futuras (Egea & Marcionilio, 2021).

As microalgas possuem relevância não apenas no âmbito ecológico, mas também desempenham papéis essenciais em diversas aplicações industriais e científicas. São empregadas na produção de alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, biocombustíveis, tratamento de águas residuais e em pesquisas científicas, especialmente no campo da biotecnologia. Adicionalmente, pesquisas estão em andamento para explorar ainda mais o potencial das microalgas em áreas como nutrição, farmacologia e energia renovável (Guerra, 2019).

Nos últimos dez anos, tem havido um notável interesse nas microalgas como fonte primária na indústria de biocombustíveis, devido ao seu diversificado potencial energético. As propriedades físico-químicas dos óleos derivados de microalgas assemelham-se aos óleos vegetais amplamente utilizados na produção em grande escala de biodiesel. Conseqüentemente, as microalgas surgem como candidatas viáveis para a produção desse tipo

de biocombustível em larga escala, destacando-se também por sua notável produção de biomassa (Assis Neto, 2022).

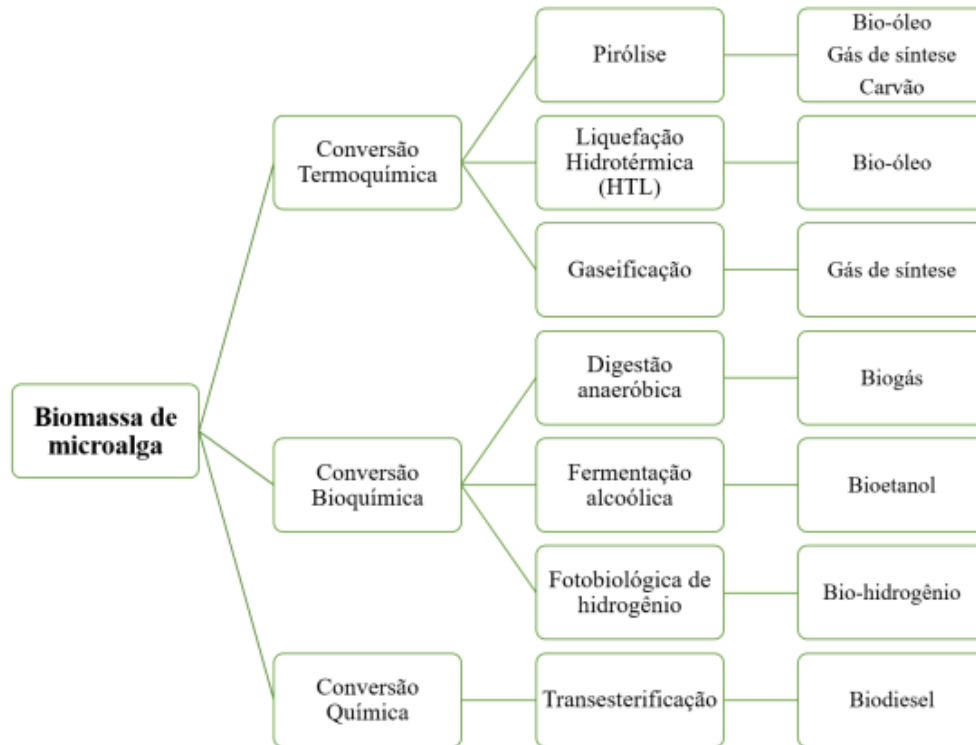
Conforme Fonseca (2016), as microalgas têm sido empregadas globalmente para diversas finalidades. Além de apresentarem elevado teor de lipídios e carboidratos, destacam-se como uma excelente matéria-prima devido ao seu rápido crescimento e eficácia na absorção de CO₂. Suas aplicações abrangem a produção de biocombustíveis, a extração de pigmentos, bem como o tratamento de efluentes industriais e esgoto.

Pina *et al.* (2021) apresenta que as microalgas, organismos unicelulares fotossintéticos, exibem diversas características físico-químicas cruciais, cuja expressão varia conforme a espécie e as condições ambientais de cultivo. Abaixo são destacadas algumas das principais propriedades físico-químicas das microalgas que são, tamanho, composição bioquímica, diferentes tipos de pigmentos, taxa de crescimento, produção de compostos específicos, demanda nutricional e habitat. Essas características fazem das microalgas organismos extremamente versáteis e fundamentais para diversas aplicações, abrangendo alimentação humana e animal, produção de biocombustíveis, tratamento de efluentes, síntese de compostos bioativos, entre outras aplicações industriais e ambientais.

Além de suas diversas aplicações na indústria, as microalgas conquistaram um espaço significativo no cenário da bioenergia, sendo reconhecidas como os biocombustíveis de terceira geração devido ao seu notável potencial na produção de diversos biocombustíveis, incluindo biodiesel, bioetanol e bio-hidrogênio. A utilização de microalgas é considerada uma fonte viável de biomassa, gerando grandes expectativas no setor energético (Borges, 2019).

Na produção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas, todos os principais componentes são explorados. Para isso, diversos processos de conversão são empregados, variando conforme o componente extraído para a produção e o tipo de biocombustível desejado. Esses métodos de conversão podem ser categorizados em processos termoquímicos, bioquímicos e químicos (Ferreira, *et al.*, 2021). Os processos de conversão oriundos das microalgas são esquematizados na Figura 16.

Figura 16 - Fluxograma sobre os processos de conversão e produtos gerados a partir da biomassa de microalga.



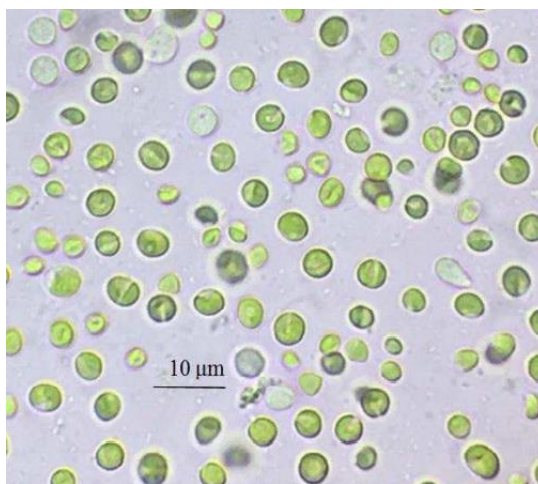
Fonte: Ferreira et al. (2021).

3.4.1. Microalga *Chlorella* sp.

A *Chlorella* sp. pertence ao gênero *Chlorella* e está classificada no grupo de algas verdes unicelulares do Filo *Chlorophyta*. As microalgas desse gênero são unicelulares, de dimensões microscópicas e pertencentes ao reino Eucariota (Figura 17). Elas são comumente encontradas em lagos, onde exibem uma elevada atividade fotossintética (Vidal, 2016).

Em condições ideais, essas espécies têm a capacidade de acumular quantidades significativas de óleo, amido e clorofila dentro de suas células. Esse armazenamento permite um crescimento acelerado, resultando em um desenvolvimento robusto para a produção de produtos de alto valor agregado (Vieira, 2013).

Figura 17 - *Chlorella vulgaris*.



Fonte: Assis Neto (2022).

Cavalcanti (2020), apresenta em seus estudos que a *Chlorella* sp. é uma variedade de microalga unicelular, pertencente ao gênero *Chlorella*, reconhecida por sua relevância em diversas áreas, como alimentação, suplementação nutricional, produção de biocombustíveis e tratamento de efluentes. Como uma das microalgas mais estudadas, a *Chlorella* tem sido amplamente explorada por suas propriedades benéficas, como:

- **Nutrição:** reconhecida como uma excelente fonte de nutrientes, a *Chlorella* é abundante em proteínas de alta qualidade, contendo todos os aminoácidos essenciais. Além disso, apresenta vitaminas (incluindo a vitamina B12, vitamina C e beta-caroteno, precursor da vitamina A), minerais (ferro, cálcio, magnésio, zinco), ácidos graxos ômega-3 e outros compostos benéficos;
- **Saúde digestiva:** a *Chlorella* pode contribuir para a melhoria da saúde do sistema digestivo, favorecendo a função intestinal e criando um ambiente propício para a microbiota intestinal;
- **Potencial antioxidante:** devido ao seu teor elevado de antioxidantes, a *Chlorella* pode desempenhar um papel na neutralização de radicais livres, associados ao estresse oxidativo e ao envelhecimento celular;
- **Produção de biocombustíveis:** microalgas, incluindo a *Chlorella*, são objeto de estudo para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel, devido à sua alta concentração de lipídios;
- **Efluentes e tratamento de água:** em algumas estações de tratamento de água e efluentes, a *Chlorella* é utilizada para auxiliar na remoção de nutrientes indesejados, como nitrogênio e fósforo, contribuindo para a purificação e descontaminação da água;

- **Alimento para peixes e animais:** amplamente empregada na aquicultura, a *Chlorella* serve como alimento para peixes e outros animais aquáticos, graças à sua alta concentração de proteínas e nutrientes essenciais.

Morfológicamente, algumas espécies do gênero *Chlorella* apresentam elementos semelhantes aos encontrados em plantas, que pertencem a outro reino. O citoplasma dessas microalgas é constituído por água, proteínas solúveis e minerais, servindo como o local de alojamento das organelas. A mitocôndria exibe uma membrana de dupla camada, contendo proteínas e fosfolípidios. O cloroplasto é único, com uma membrana externa permeável a metabólitos e íons, enquanto sua membrana interna facilita o transporte de proteínas (Assis Neto, 2022).

A reprodução dessas microalgas é assexuada e não móvel, caracterizada por uma rápida multiplicação. De acordo com Safi et al. (2014), "em 24 horas, uma célula de *C. vulgaris*, cultivada em condições ideais, se multiplica por autoesporulação, que é a forma mais comum de reprodução assexuada em algas".

As microalgas do gênero *Chlorella* podem apresentar uma composição nutricional significativa, com 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais. Além disso, contêm mais de 2% de clorofila e 8% de componentes não identificados, promovendo um crescimento rápido. Assim como as plantas superiores, essas microalgas dependem principalmente da fotossíntese como seu principal processo metabólico, utilizando a luz solar como fonte principal de energia (Chiesa, 2019).

3.4.2. Cianobactéria *Oscillatoria* sp.

As cianobactérias são microrganismos unicelulares que podem existir individualmente ou formar colônias (Figura 18). Seu tamanho é apenas de alguns micrômetros, tornando-os visíveis apenas sob um microscópio. Esses microrganismos realizam a fotossíntese, com a clorofila dispersa no citoplasma, uma característica distintiva em relação aos organismos do Reino Plantae, nos quais a clorofila está organizada nos cloroplastos (Perreira, 2020).

Grandíssimo, Mourão e Santos (2020) afirmam que as cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas (algas azuis), são fotoautotróficas, dependendo de água, dióxido de carbono, luz e substâncias inorgânicas para seus processos vitais. Suas estruturas celulares são notavelmente similares às das bactérias.

Figura 18 - Cianobactérias.

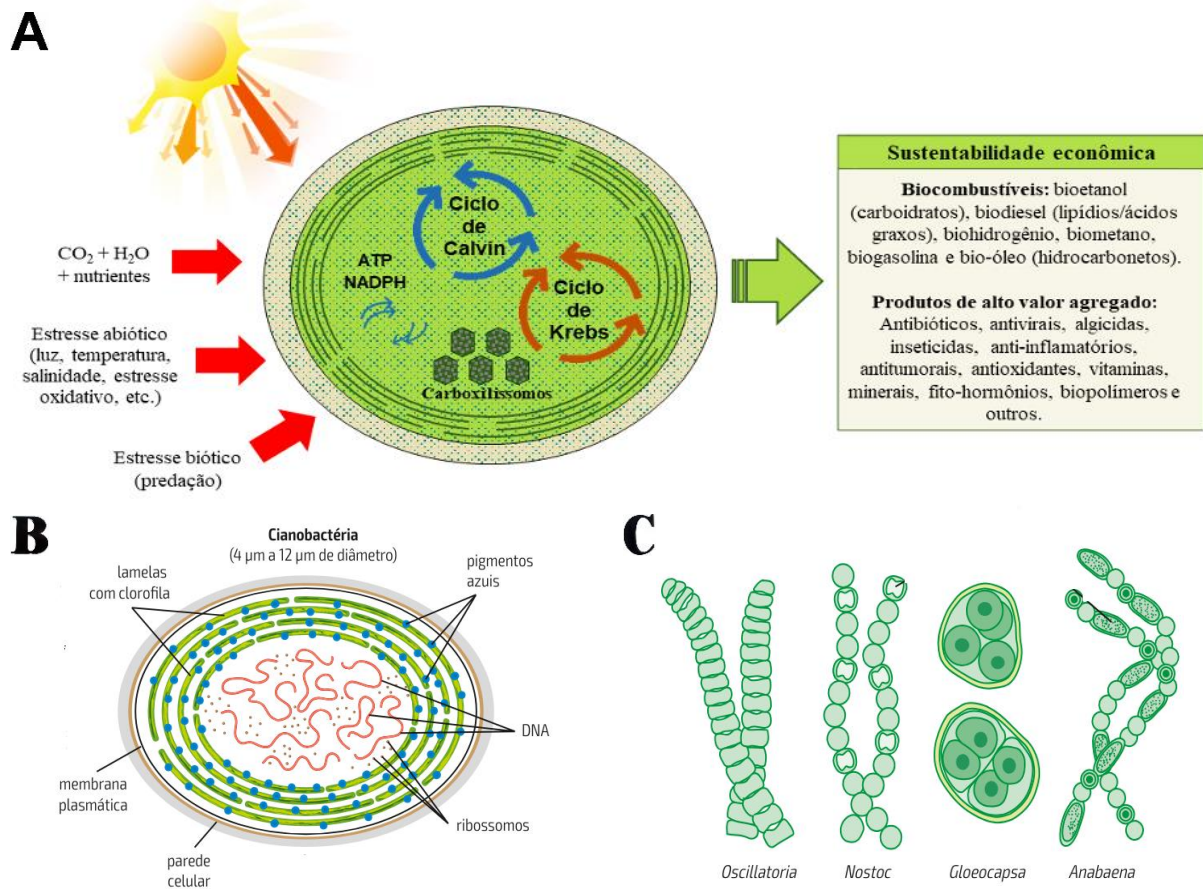


Fonte: Pereira (2020).

As cianobactérias são microrganismos unicelulares que podem existir individualmente ou formar colônias (Figura 19). Seu tamanho é apenas de alguns micrômetros, tornando-os visíveis apenas sob um microscópio. Esses microrganismos realizam a fotossíntese, com a clorofila dispersa no citoplasma, uma característica distintiva em relação aos organismos do Reino Plantae, nos quais a clorofila está organizada nos cloroplastos (Perreira, 2020).

Em algumas colônias de cianobactérias, células especiais chamadas heterocistos são encontradas, caracterizadas por terem paredes celulares espessas. Esses heterocistos desempenham a importante função de fixação do nitrogênio: as cianobactérias capturam o gás nitrogênio e o utilizam na síntese de suas proteínas. Esse processo, associado à fotossíntese, confere a elas uma notável autonomia nutricional e desempenha um papel crucial no ciclo do nitrogênio. A reprodução das cianobactérias ocorre predominantemente de forma assexuada (Linhares, Gewandsznajde, Pacca, 2016).

Figura 19 – Representação esquemática de uma biofábrica cianobactéria e suas possibilidades biotecnológicas (A). Estrutura básica de uma cianobactéria (B). Exemplificação de alguns gêneros de cianobactérias (C)



Fonte: Adaptado de Souza (2018) e Linhares, Gewandsznajde, Pacca (2016).

Siqueira & Oliveira-Filho (2005), apresentam em seus estudos que as cianobactérias, também chamadas de algas azuis ou cianofíceas, são organismos procariontes, caracterizados pela ausência de núcleo definido, e se destacam por diversas características bioquímicas essenciais. Abaixo, destacam-se algumas das características mais relevantes desses microrganismos:

- **Pigmentos fotossintéticos:** contêm pigmentos fotossintéticos, incluindo clorofila a (o principal pigmento fotossintético) e ficobiliproteínas (ficocianina e ficoeritrina), conferindo-lhes cores que variam do verde-azulado ao azul e ao vermelho, dependendo da espécie;
- **Fotossíntese oxigênica:** realizam a fotossíntese oxigênica, processo semelhante ao das plantas, capturando luz solar para converter dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) em glicose (açúcar) e oxigênio (O_2);
- **Tilacoides:** possuem tilacoides, estruturas membranosas onde ocorre a fotossíntese, organizados de maneira simples ou em arranjos complexos, dependendo da espécie;

- **Armazenamento de energia:** acumulam substâncias de reserva, como amido ou polissacarídeos, para armazenar energia e nutrientes em condições favoráveis, utilizando-os quando as condições são desfavoráveis;
- **Fixação de nitrogênio:** algumas cianobactérias têm a capacidade única de fixar nitrogênio atmosférico, convertendo-o em formas utilizáveis, como amônia ou nitratos, essenciais para o enriquecimento de solos e águas;
- **Cianotoxinas:** algumas espécies produzem cianotoxinas, substâncias tóxicas para outros organismos, podendo representar riscos para animais e seres humanos se ingeridas em quantidades significativas;
- **Adaptabilidade ambiental:** demonstram extrema adaptabilidade, encontrando-se em diversos ambientes, desde oceanos até desertos, abrangendo água doce e locais extremos como fontes termais;
- **Colonização aquática:** certas cianobactérias formam colônias extensas em ambientes aquáticos, como lagos e lagoas, e em determinadas condições, isso pode resultar em florações de algas, impactando negativamente o ecossistema e a qualidade da água.

Essas características conferem às cianobactérias uma notável diversidade, desempenhando papéis significativos em ecossistemas aquáticos e terrestres. Importante ressaltar que, embora compartilhem características comuns, apresentam uma ampla variedade de formas, tamanhos e adaptações específicas a diferentes ambientes (Siqueira & Oliveira-Filho, 2005).

Nos estudos conduzidos por Santana (2019), é apresentado que a *Oscillatoria* sp. é uma cianobactéria filamentosa pertencente ao gênero *Oscillatoria*, um procarionte mais conhecido como algas azuis-verdes, desempenhando um papel crucial em diversos ecossistemas, tanto aquáticos quanto terrestres. Abaixo estão algumas características e informações relevantes sobre a *Oscillatoria* sp.;

- **Filamentosa:** a *Oscillatoria* sp. se destaca por sua estrutura filamentosa, formada por cadeias de células que podem se agrupar para constituir tricomas;
- **Composição química:** A composição química das células da *Oscillatoria* sp. inclui componentes como proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos fotossintéticos, entre outros. A proporção desses componentes pode ser influenciada por fatores ambientais e de cultivo;

- **Autotrófica:** assim como outras cianobactérias, a *Oscillatoria* sp. é autotrófica, realizando fotossíntese para produzir seu próprio alimento a partir de dióxido de carbono, água e luz solar;
- **Ambientes aquáticos:** comumente encontrada em ambientes aquáticos, como lagos, rios e lagoas, demonstrando uma capacidade de prosperar em diversas condições e contribuindo para a formação de comunidades fitoplanctônicas;
- **Fixação de nitrogênio:** algumas espécies de *Oscillatoria* têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, convertendo-o em formas utilizáveis, influenciando positivamente o enriquecimento de nutrientes em ecossistemas aquáticos.
- **Produção de mucilagem:** a *Oscillatoria* sp., assim como outras cianobactérias, pode secretar mucilagem, uma substância gelatinosa que envolve os tricomas. Esse fenômeno pode resultar na formação de biofilmes ou cianobactérias aderindo à superfícies subaquáticas;
- **Adaptação a condições variáveis:** as cianobactérias, incluindo a *Oscillatoria* sp., possuem a capacidade de se adaptar a uma ampla variedade de condições ambientais, desde ambientes de água doce até ambientes salinos;
- **Pigmentos fotossintéticos:** contém pigmentos fotossintéticos, como clorofila a (principal pigmento fotossintético), ficocianina (azul) e ficoeritrina (vermelha), responsáveis pela absorção de luz durante a fotossíntese;
- **Compostos lipídicos:** podem acumular lipídios em suas células, e isso é de interesse na pesquisa de biocombustíveis, pois esses lipídios podem ser transformados em biodiesel;
- **Produção de proteínas:** são conhecidas por serem ricas em proteínas. Estas podem incluir enzimas envolvidas em processos metabólicos, bem como proteínas estruturais e funcionais;
- **Carboidratos:** acumulam carboidratos em suas células, incluindo amido e outros polissacarídeos, como uma forma de reserva de energia;
- **Compostos antioxidantes:** algumas cianobactérias produzem compostos antioxidantes, que ajudam a proteger as células contra o estresse oxidativo;
- **Ácidos graxos:** produzem ácidos graxos, que podem ter aplicações em biotecnologia, incluindo na produção de biocombustíveis;

É importante ressaltar que algumas cianobactérias, incluindo certas espécies de *Oscillatoria*, podem produzir toxinas, representando potenciais riscos à saúde humana e animal, especialmente durante florações em massa conhecidas como "marés vermelhas" ou

"florescências de algas". Portanto, a presença da *Oscillatoria* sp. em ambientes aquáticos demanda monitoramento e avaliação, especialmente em áreas propensas a proliferações excessivas (Santana, 2019).

Perreira (2020) investiga em seus estudos diversos aspectos sobre as cianobactérias em especial a *Oscillatoria* sp. onde a pesquisa está em constante evolução, com diversas aplicações em diferentes setores. Algumas das maneiras como essas cianobactérias podem ser utilizadas incluem a biorremediação, produção de biocombustíveis, alimentação humana e animal, fertilizantes, cosméticos e biopolímeros.

3.4.3. Fatores importantes para o cultivo de microalgas e cianobactérias

Chiesa (2019) destaca que os processos biotecnológicos envolvidos na transformação da biomassa de microalgas e cianobactérias em produtos de alto valor agregado estão revelando suas potencialidades em várias pesquisas. Embora os lipídeos, carboidratos e pigmentos sejam altamente promissores, o elevado teor proteico pode impor limitações à utilização desse recurso algal. Diversos fatores podem influenciar a composição dessa biomassa, a qual pode ser ajustada por meio de parâmetros cruciais no cultivo de microalgas e cianobactérias, incluindo a metodologia de cultivo (tipo de reator, ambiente aberto ou fechado), tempo de cultivo, limitação ou excesso de nutrientes (com adição de vitaminas), intensidade luminosa, aeração, pH, temperatura e a combinação desses fatores por meio de planejamentos estatísticos.

Cada espécie de microalgas ou cianobactérias requer condições específicas para seu cultivo. As condições ótimas e os parâmetros de cultivo precisam ser otimizados para alcançar elevadas quantidades dos bioprodutos desejados. Algumas das microalgas mais empregadas na produção de óleo incluem *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Nannochloropsis*, entre outras (Chiesa, 2019).

O metabolismo de determinadas espécies de microalgas e cianobactérias pode ser modificado conforme as mudanças ambientais. O cultivo de microalgas pode ser fotoautotrófico, utilizando a luz como única fonte de energia; heterotrófico, quando compostos orgânicos são usados como fonte de carbono e energia; e mixotrófico, quando tanto o metabolismo autotrófico quanto o heterotrófico podem ser empregados (Angelo; Andrade; Colozzi-Filho, 2014).

Borges (2014) e Perreira (2020), apresentam em suas pesquisas que cultivar microalgas e cianobactérias pode ser uma atividade benéfica, uma vez que esses organismos

unicelulares são empregados em diversas aplicações, como alimentos, suplementos nutricionais, produção de biocombustíveis, tratamento de águas residuais, e até mesmo como fontes de produtos químicos e farmacêuticos.

3.4.3.1. Condições nutricionais

A composição da biomassa microalgal inclui, além do carbono, pelo menos 19 elementos químicos. Alguns desses elementos são necessários em concentrações da ordem de miligramas por litro, como Mg, Ca, Na, K, S, P, O, N e H. Por outro lado, os micronutrientes, como Si, Fe, Mn, Cu, Co, Zn, B e V, são requeridos em escalas de nanogramas a microgramas por litro. Esses micronutrientes desempenham papel fundamental, sendo incorporados em moléculas orgânicas essenciais que participam de reações vitais para a vida celular (Hakalin, 2014).

A escolha do meio nutricional desempenha um papel crucial no cultivo de microalgas e cianobactérias, e isso deve ser feito levando em consideração os objetivos finais do processo. Elementos como C, N, H, O, P, Mg, Cu, Zn e Mo são particularmente significativos para o cultivo desses microrganismos, conforme ilustrado na Tabela 3 (Borges, 2014).

Tabela 3 - Elementos necessários para o crescimento de cianobactérias e microalgas e suas funções metabólicas.

Elemento	Funções
Carbono	Componente de diversas substâncias celulares
Nitrogênio	Constitui proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes.
Fósforo	Componente estrutural e transferência de energia.
Enxofre	Grupo ativo de enzimas e coenzimas e componente estrutural.
Potássio	Regulação osmótica, controle de pH e estabilidade de proteínas.
Magnésio	Constituinte da molécula de clorofila e ativação enzimática.
Ferro	Participação das vias biossintéticas da clorofila e do citocromo, respiração, fotossíntese e co-fator de diversas enzimas.
Manganês	Co-fator de enzimas.
Molibdênio	Atua no metabolismo do nitrogênio e como co-fator de enzimas.
Cobalto	Componente da vitamina B12 e atua no metabolismo do nitrogênio.
Boro	Composição de algumas enzimas do metabolismo primário.
Zinco	Componente estrutural de diversas enzimas.
Sódio	Ativação enzimática de diversas enzimas.
Cálcio	Componente estrutural, ativação enzimática e co-fator no transporte de íons.
Cobre	Transporte de elétrons na fotossíntese, enzima, necessário na síntese de clorofila.
Cloro	Atua no fotossistema II e metabólitos secundários.

Fonte: Cordeiro (2015).

3.4.3.1.1. Nitrogênio

O nitrogênio pode ser presente no meio de cultivo de diversas formas, como íon nitrato, amônia e íon amônio. A utilização de qualquer um desses compostos como a única fonte de nitrogênio pode resultar em alterações no pH. No entanto, para as microalgas, não há diferenças significativas em qualquer forma escolhida como fonte de nitrogênio. O emprego do nitrogênio no meio de cultivo revela-se de extrema importância na quantidade de lipídeos armazenados em suas células, influenciando na relação biomassa-lipídeos (Chiesa, 2019).

3.4.3.1.2. Zinco

O zinco desempenha um papel fundamental como componente estrutural e bioquímico nas microalgas. Sua atuação abrange a composição de compostos celulares e a estrutura da anidrase carbônica, desempenhando um papel crucial no transporte e fixação de CO₂ (Chiesa, 2019). Além disso, o zinco atua como co-fator na estrutura de enzimas e desempenha papéis metabólicos essenciais na síntese de ácidos graxos (Borges, 2014).

3.4.3.1.3. Fosfato

O fosfato desempenha um papel direto nos processos bioquímicos associados às trocas energéticas nas células de algas. Suas funções incluem atuar na transferência de energia e na constituição de moléculas estruturais. A assimilação do fósforo é influenciada pela luz, provavelmente devido à acumulação de energia em ATP. Embora polifosfatos e açúcares fosfatados possam servir como fontes de fósforo, sua absorção requer uma hidrólise extracelular para se tornar viável (Borges, 2014). Em seus estudos, Oliveira (2019) destaca que a incorporação de fósforo no meio nutricional de microalgas e cianobactérias contribui para a respiração celular e fotossíntese.

3.4.3.2. O cultivo de microalgas e cianobactérias

Os sistemas de cultivo de microalgas foram concebidos nas primeiras décadas do século XX e podem ser classificados como abertos ou fechados. Os sistemas abertos ocorrem em tanques de diversos tamanhos, mantidos a céu aberto, sujeitos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação (Hakalin, 2014).

Os sistemas de lagoas abertas, geralmente construídos com concreto e de profundidade reduzida, oferecem um ambiente menos protegido contra contaminações em comparação com os fotobiorreatores fechados. Estes últimos proporcionam um ambiente mais controlado, possibilitando maior rendimento por área e volume, além de cultivar microalgas com maior grau de pureza (Qin; Lei & Wu, 2018).

Embora estratégias de cultivo possam estimular o crescimento celular, a produção requer precauções para evitar contaminação, minimizar a evaporação de água e favorecer a absorção de luz, visando a redução de custos operacionais (Oliveira, 2019). A Tabela 4

apresenta uma comparação das características entre diferentes tipos de cultivo desses microrganismos.

Tabela 4 - Comparação das características de diferentes tipos de cultivos de microalgas.

-	Fototrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Fotoheterotrófico
Fonte de energia	Luz	Orgânica	Luz e orgânica	Luz
Fonte de carbono	Inorgânica	Orgânica	Inorgânica e orgânica	Orgânica
Densidade celular	Baixa	Alta	Média	Média
Tipo de reator	Aberto ou fotobiorreator	Fermentador convencional	Fotobiorreator fechado	Fotobiorreator fechado
Custo	Baixo	Médio	Alto	Alto
Principais desvantagens	Baixa densidade; Contaminação em sistema aberto	Alto custo de substrato; Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento; Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento; Risco de contaminação

Fonte: Hakalin (2014).

3.4.3.3. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias

O co-cultivo de microrganismos implica no cultivo simultâneo de diversas espécies, combinando bactérias, leveduras, cianobactérias e microalgas para criar uma representação mais realista do ambiente natural. Essas práticas de co-cultivo são amplamente documentadas na literatura da biotecnologia, sendo aplicadas em estudos de biorremediação, produção de biocombustíveis e biomoléculas de elevado interesse industrial ou farmacêutico (Magdouli; Brar & Blais, 2016).

A essência central do co-cultivo reside na ideia de que esses organismos coexistem naturalmente no ambiente, já estabelecendo algum tipo de relação ecológica. Nos ecossistemas, essa coexistência pode envolver a inibição mútua por meio de compostos alopáticos ou o favorecimento de algumas espécies pela liberação de metabólitos no meio (Dextro, 2021).

Com o intuito de aprimorar a produtividade da biomassa e sua utilização, o co-cultivo de microalgas, também conhecido como cultura mista, surge como uma das principais opções. Em um sistema de cultura alga-alga ou alga-cianobactéria, as algas desenvolvem-se como um consórcio ou colônia, estabelecendo relações mutualistas ou competitivas. Na interação competitiva, uma espécie se beneficia às custas da outra por meio de redução na aptidão, exploração ou parasitismo, enquanto na interação cooperativa, cada indivíduo beneficia-se das atividades do outro. A interação cooperativa entre microalgas pode contribuir para a utilização de nutrientes no sistema e promover o crescimento das algas (Zhu *et al.*, 2019).

Em ambientes experimentais, o co-cultivo pode envolver a combinação de diferentes espécies desses organismos, proporcionando a degradação de substratos complexos ou o aumento da produção de lipídios sem perda de biomassa (Dextro, 2021).

A promoção do crescimento de microalgas por meio de bactérias e outros microrganismos foi observada em várias espécies, incluindo *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* e algumas espécies de *Azo spirillum*. A associação entre eles pode ter impactos positivos, dependendo das espécies envolvidas e dos objetivos específicos do co-cultivo. Algumas bactérias e microalgas, por exemplo, podem estabelecer associações ecológicas harmoniosas, sendo especialmente vantajosas no tratamento de efluentes, onde o cultivo separado seria menos eficiente do que o co-cultivo (Dutra, 2021).

Condições estressantes associadas a poluentes, carência de nutrientes e intensidade luminosa também são exploradas em condições de co-cultivo, com a esperança de compreender os mecanismos de sinergia que possibilitam a sobrevivência de comunidades (Antunes; Leão; Vasconcelos, 2012).

Existem espécies resistentes que podem ser estimuladas pela presença de outras no mesmo meio de cultura ou ambiente. Esses mecanismos de sinergia podem variar de acordo com os relacionamentos específicos entre as espécies (Magdouli; Brar; Blais, 2016).

Tanto os sistemas de monocultivo quanto os de co-cultivo requerem um suprimento substancial de nutrientes para o crescimento de microalgas. Os macronutrientes essenciais para a produção de algas incluem nitrogênio e fósforo, representando cerca de 10–20% da biomassa de microalgas. A disponibilidade de nutrientes é um fator crucial que regula o desenvolvimento do sistema de produção de microalgas (Zhu *et al.*, 2019).

Park *et al.* (2021) demonstram em seu estudo que a utilização e co-cultivo de microrganismos, como bactérias, podem favorecer a síntese de compostos de alto valor agregado, dependendo do tipo de cultivo, proporções de inóculo e espécies escolhidas.

Estudos indicam que as interações entre microalgas e bactérias têm impacto direto em seu metabolismo, possibilitando uma metabolização mais eficiente de nutrientes e metais pesados. Além disso, o co-cultivo de microalgas com outros microrganismos apresenta-se como uma alternativa promissora para substituir sistemas de tratamento biológicos convencionais baseados apenas em monoculturas. Uma característica crucial dessa relação é a capacidade das bactérias de decompor componentes complexos do efluente, convertendo substâncias orgânicas simples que podem ser facilmente consumidas pelas microalgas (Dutra, 2021).

4. METODOLOGIA

4.1. Microalgas e cianobactérias

A produção de biomassa, lipídeos e biodiesel a partir de microalgas e cianobactérias envolveu a utilização da microalga *Chlorella* sp. e da cianobactéria *Oscillatoria* sp. em um sistema de co-cultura. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios CT-Infra 2 e 3 dos Cursos de Ciências Biológicas e Química, vinculados ao Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, no Campus Pontal em Ituiutaba – MG.

As cepas de microalgas e cianobactérias empregadas nesta pesquisa foram gentilmente cedidas pelo Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, localizado em Diamantina – MG. As cepas foram isoladas no Laboratório de Biocombustíveis e Green Chemistry (LABIOGREENC) e mantidas no Laboratório de Microscopia, Morfometria e Identificação (LAMMI).

Grande parte dos testes experimentais foram conduzidos nos Laboratórios de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia, bem como no Laboratório de Química de Materiais. Todas as análises foram realizadas em ambientes controlados.

4.1.1. Co-cultura de microalgas e cianobactérias

O Laboratório de Microscopia, Morfometria e Identificação (LAMMI) possui em seu estoque espécies de microalgas, incluindo *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp., e uma cianobactéria, a *Oscillatoria* sp. Os experimentos relacionados ao cultivo, rendimento de biomassa e crescimento celular foram conduzidos semanalmente. Contudo, devido à contaminação de um fotobioreator de *Chlorella* sp. por um fotobioreator de *Oscillatoria* sp., decidiu-se investigar as condições de cultivo, crescimento celular, rendimento de biomassa, lipídeos, porcentagem de óleo em suas células e as potencialidades da co-cultura em diversas áreas dos biocombustíveis.

As co-culturas de microalgas e cianobactérias foram mantidas em um sistema de cultivo com um fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, mantidos em temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme ilustrado na Figura 20.

Figura 20 - Condições operacionais para cultivo de microalgas e cianobactérias.

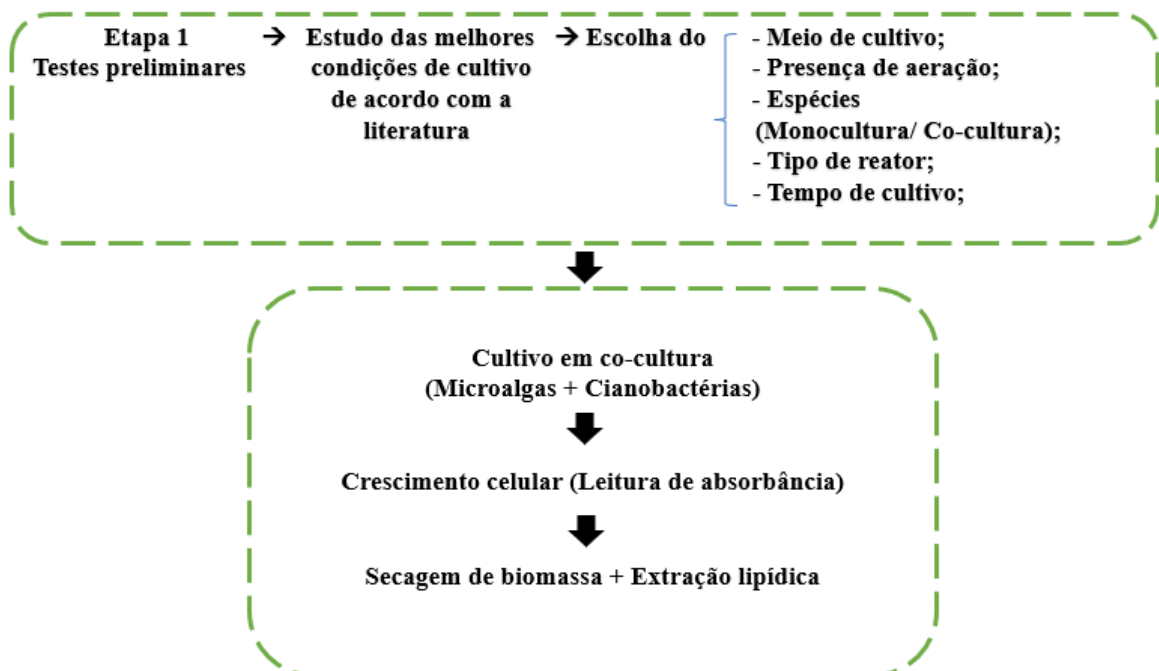


Fonte: próprio autor (2024).

4.2. Testes preliminares

A abordagem metodológica empregada nos testes iniciais seguiu a sequência apresentada no fluxograma da Figura 21.

Figura 21 – Fluxograma da abordagem metodológica empregada nos testes preliminares.



Fonte: próprio autor (2024).

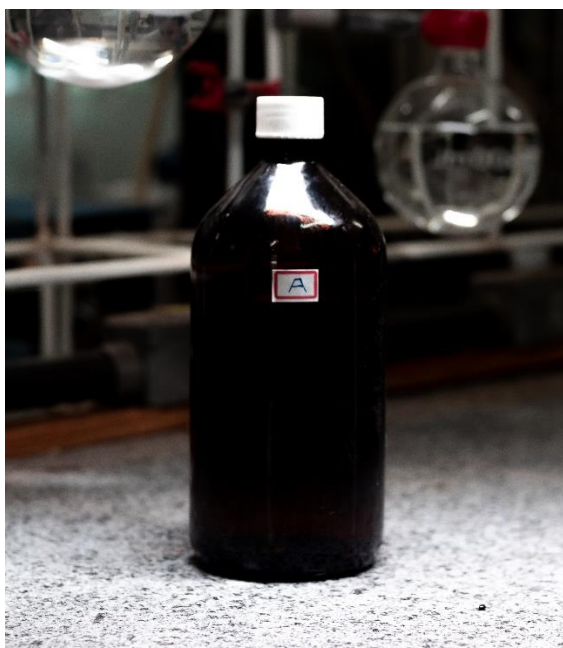
4.2.1. Cultivo de microalgas-cianobactérias em um sistema de co-cultura

A partir da ocorrência de contaminação das microalgas com as cianobactérias, foram conduzidos testes preliminares com o intuito de avaliar as capacidades e o perfil dessa nova cultura/ co-cultura. Sabe-se que em ambientes naturais, as interações entre microalgas-microalgas, microalgas-cianobactérias e cianobactérias-cianobactérias, podem resultar em relações ecológicas harmônicas ou mesmo desarmônicas. Estes testes tiveram o objetivo de compreender essas relações ecológicas e examinar as potencialidades da co-cultura no âmbito dos biocombustíveis.

Para os testes realizados com a co-cultura (microalga-cianobactéria) foi empregado o meio ASM1 modificado (Hakalin, 2014) sem adição de vitaminas e com a correção de pH, conforme a Tabela 5.

O meio de cultivo ASM1 modificado, conforme ilustrado na Figura 22 e adaptado conforme a metodologia de Hakalin (2014). Na Tabela 5, são detalhados todos os reagentes empregados na preparação do meio de cultivo ASM1 modificado para uma quantidade correspondente a 1 litro de água destilada. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 8,0.

Figura 22 - Meio de cultivo ASM1 (modificado) armazenado em vidro âmbar.



Fonte: próprio autor (2024).

Tabela 5 - Composição do meio de cultivo ASM1 modificado para co-cultura de microalgas e cianobactérias.

Componentes	Concentração final (mg/L⁻¹)
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	170
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	49
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	41
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	29
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	17,4
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	35,6
Cloreto de Ferro (III) (FeCl ₃)	0,65
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	2,48
Cloreto de Manganês (II) (MnCl ₂)	1,39
Cloreto de Zinco (ZnCl ₂)	0,33
Cloreto de Cobalto (II) (CoCl ₂)	0,049
Cloreto de Cobre (CuCl)	0,0014
EDTA	8,24

Fonte: Hakalin, 2014.

Para conduzir o cultivo de microalgas com o meio ASM1 (modificado), foram realizadas a pesagem e a adição de todos os componentes listados na Tabela 5, seguido pela incorporação de 1 litro de água destilada. Após a preparação do meio de cultivo, a solução resultante foi transferida para um frasco âmbar previamente higienizado e esterilizado. Em seguida, a medição de 5 mL da solução do meio ASM1 (modificado) foi realizada para cada 1 litro de água, conforme indicado na Figura 23.

Posteriormente, a preparação do meio e a medida do inóculo seguiram as orientações de Borges (2014) e Hakalin (2014). As proporções adotadas foram de 80% de meio para 20% de inóculo (microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura). Essas proporções foram calculadas para um volume de 1 litro, como apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Inóculo de 20% (200 mL) para cultivo em um sistema de co-cultura de microalgas e cianobactérias.



Fonte: próprio autor (2024).

Dessa forma, o experimento foi conduzido da seguinte forma:

- Meio de cultivo: ASM1;
- Presença de aeração: não;
- Espécies: *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp. em co-cultura;
- Tipo de reator: frascos de vidro boro 3.3 graduados;
- Tempo de cultivo: 21 dias.

Os testes foram conduzidos utilizando os parâmetros otimizados previamente pelo autor em estudos anteriores com monoculturas em *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Desmodesmus* sp., embora tenha sido consultada a literatura, observa-se uma escassez de pesquisas que abordem especificamente o cultivo em co-cultura entre microalgas e cianobactérias no contexto da produção de biomassa e lipídeos para biocombustíveis. Esta lacuna representa um desafio significativo para a revisão de literatura nesse campo, especialmente quando se considera a interação entre as espécies *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp.

É crucial compreender a dinâmica dessa interação em co-culturas microalga-cianobactéria, uma vez que os efeitos podem ser tanto positivos quanto negativos. Caso sejam identificados efeitos adversos, isso pode inviabilizar a continuidade do estudo. No entanto, se os efeitos forem favoráveis, novos parâmetros e análises mais detalhadas serão necessários para investigar as interações ecológicas entre as espécies presentes na co-cultura, bem como as relações bioquímicas e físico-químicas que podem influenciar a síntese de lipídeos,

biomassa, produção de óleo em suas células, síntese de biodiesel *in situ* e produção de biochar, visando a área de biocombustíveis.

4.3. Matriz de experimentos DOEHLERT para cultivo de microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura e metodologia empregada

Na condução de uma pesquisa, a escolha do tipo de planejamento a ser adotado depende das condições experimentais e dos objetivos pretendidos. A matriz Doehlert, sendo um planejamento de segunda ordem, destaca-se por possibilitar a identificação de pontos críticos, como máximos, mínimos e centrais, em cada fase do processo de otimização. Uma vantagem significativa desse tipo de planejamento é a sua capacidade não apenas de relacionar as influências das variáveis na resposta, mas também de otimizar a resposta obtida (Neves, 2022).

A matriz Doehlert é frequentemente empregada na química analítica, especialmente para otimização de metodologias, apresentando vantagens sobre outros desenhos experimentais. Este tipo de matriz prevê a realização de um menor número de experimentos, proporcionando maior eficiência em relação aos resultados esperados (RUSCHEL *et al.*, 2016).

Para determinar as condições ideais de produção de biomassa, rendimento de óleo e crescimento das microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura, utilizou-se um planejamento experimental Doehlert. Esta ferramenta estatística possibilitou a identificação das variáveis experimentais que afetam de maneira importante e significativa o rendimento de lipídeos no crescimento das microalgas. As variáveis estudadas foram a quantidade de zinco, nitrato e fosfato. A Tabela 6 apresenta as variáveis e os níveis estudados no planejamento experimental Doehlert.

Tabela 6 - Matriz de experimentos DOEHLERT para cultivo de microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura

MATRIZ DE EXPERIMENTOS - MATRIZ DOEHLERT						
EXP.	FOSFATO		ZINCO		NITRATO	
1	1,000	22,4	0,0000	0,33	0,000	0,170
2	0,500	19,9	0,8660	0,63	0,000	0,170
3	0,500	19,9	0,2890	0,43	0,817	0,255
4	-1,000	12,4	0,0000	0,33	0,000	0,170
5	-0,500	14,9	-0,8660	0,03	0,000	0,170
6	-0,500	14,9	-0,2890	0,23	-0,817	0,085
7	0,500	19,9	-0,8660	0,03	0,000	0,170
8	0,500	19,9	-0,2890	0,23	-0,817	0,085
9	0,000	17,4	0,5770	0,53	-0,817	0,085
10	-0,500	14,9	0,8660	0,63	0,000	0,170
11	-0,500	14,9	0,2890	0,43	0,817	0,255
12	0,000	17,4	-0,5770	0,13	0,817	0,255
13	0,000	17,4	0,0000	0,33	0,000	0,170
14	0,000	17,4	0,0000	0,33	0,000	0,170
15	0,000	17,4	0,0000	0,33	0,000	0,170

x1 gramas x2 Gramas x3 gramas

Fonte: próprio autor (2024).

Para a realização do co-cultivo utilizando a matriz de planejamento Doehlert, foi conduzida uma revisão bibliográfica inicial para identificar quais macro e micronutrientes poderiam influenciar no rendimento de biomassa, óleo e rendimento de óleo em espécies de microalgas e cianobactérias. Com base nessa pesquisa, e adotando o meio de cultivo ASM1 modificado, conforme Hakalin (2014), foram ajustadas as quantidades de fosfato, zinco e nitrato para os 15 experimentos realizados, conforme indicado na Tabela 6.

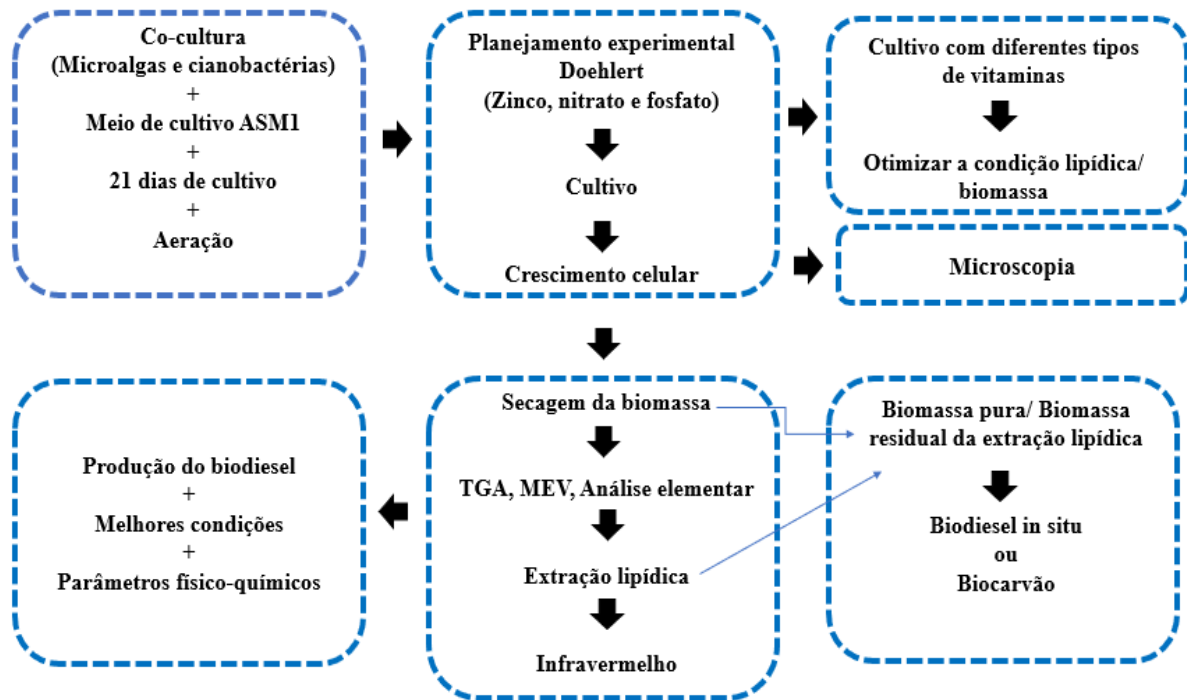
Na Tabela 6, os experimentos estão numerados de 1 a 15, sendo que nas colunas 2 e 3 estão apresentados os valores codificados e decodificados para o fosfato, nas colunas 4 e 5 para o zinco, e nas colunas 6 e 7 para o nitrato.

Os valores codificados para o fosfato, tais como 1,000; 0,500; 0,000; -0,500 e -1,000, representam as quantidades utilizadas do nutriente fosfato, sendo 22,4g para o valor

codificado de 1,000, de acordo com o meio ASM1. Essas quantidades foram variadas para otimizar o experimento.

A abordagem metodológica, partindo do cultivo de microalgas e cianobactérias e utilizando o planejamento experimental Doehlert, seguiu a sequência apresentada no fluxograma da Figura 24.

Figura 24 - Fluxograma da abordagem metodológica empregada.



Fonte: próprio autor (2024).

4. 4. Quantidade de inóculo

Utilizou-se o mesmo modelo de cultivo foi adotado por Dextro (2021) em um sistema de cultivo contendo microalgas e cianobactérias durante 21 dias, conforme ilustrado na Figura 25. Em cada ciclo de cultivo subsequente, uma proporção de 20% de inóculo contendo microalgas e cianobactérias foi combinada com 80% de meio de cultivo, além de água destilada, totalizando 1 litro para cada reator no regime de batelada, conforme descrito por Borges (2014).

Figura 25 - Co-cultura de microalgas e cianobactérias.



Fonte: próprio autor (2024).

4. 5. Unidade experimental e condições de cultivo

As microalgas e cianobactérias foram organizadas em cinco prateleiras uniformemente distribuídas em uma escala laboratorial, sendo iluminadas por duas lâmpadas do tipo "luz do dia" em um sistema de cultivo com volume total de 1 litro. O cultivo foi conduzido em frascos de vidro boro 3.3 graduados, previamente utilizados e fechados com algodão para facilitar as trocas gasosas, reduzir a evaporação e prevenir a contaminação. As condições ambientais foram mantidas a uma temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com um fotoperíodo controlado de 12 horas luz e 12 horas escuro, utilizando duas lâmpadas fluorescentes brancas de 40 volts, semelhante ao arranjo experimental adotado por Ramirez (2013) e Hakalin (2014).

A aeração implementada neste estudo teve como objetivo homogeneizar o cultivo. Após a preparação dos meios, eles foram posicionados nos suportes, e os dispositivos de aeração foram conectados e operados continuamente ao longo do ciclo de cultivo, utilizando o aparelho modelo A420, 110V, com uma taxa de fluxo de 4,5 litros de ar por minuto. Essa aeração proporcionou a oxigenação do sistema, promovendo uma distribuição mais uniforme e garantindo maior contato dos nutrientes com as microalgas e cianobactérias por meio da agitação constante.

4.6. Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o ASM1 modificado, citado na seção dos testes iniciais.

4.7. Avaliação de crescimento celular através de espectroscopia e biomassa seca produzida

Galo & Colombo (2009), apresentam em seus estudos que o espectrofotômetro é um instrumento de análise óptica amplamente utilizado em laboratórios para medir a absorção ou a transmissão de luz por uma amostra em diferentes comprimentos de onda. Esse equipamento é comumente utilizado em diversas áreas, incluindo química, bioquímica, farmácia, ciências ambientais e outras disciplinas que requerem análise quantitativa de substâncias em solução.

Assim, para avaliar a biomassa produzida e o crescimento celular, foram adotadas análises de massa seca e densidade celular. A metodologia de densidade celular possibilita a comparação dos dados de densidade ótica, também conhecida como absorvância, com as quantificações de massa seca. Isso permite criar uma curva de calibração, identificando as fases de crescimento das microalgas e determinando o período de acúmulo de lipídeos, seguindo a mesma abordagem utilizada por Sant' Anna *et al.*, (2012).

Conforme Oliveira (2019), as leituras de densidade ótica foram realizadas a cada cinco dias, em triplicata para cada alíquota de cultivo, no comprimento de onda de 570 nm, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1800. Para garantir a precisão nas análises espectrofotométricas, Cartas (2018) destaca a importância de garantir a uniformidade da alíquota, retirando-a do reator e transferindo-a para a cubeta do espectrofotômetro de 4 mL. O equipamento deve estar ajustado com a amostra "branco", representado pelo meio de cultivo. Todas as leituras foram realizadas em triplicata para avaliar a dispersão dos resultados.

4.8. pH

O pH das co-culturas foi medido diretamente por meio de leitura utilizando o papel indicador de pH. As análises foram realizadas semanalmente.

4.9. Idade do inóculo

Conforme apontado por Oliveira (2019) e Chiesa (2019), o parâmetro de cultivo mais eficiente ocorre com um inóculo de 20 a 21 dias de idade. Nesse intervalo, tanto o rendimento de lipídeos quanto o de biomassa mantêm-se em uma fase exponencial até o 20º dia. Após esse período, o cultivo entra na fase estacionária, seguida por uma fase de decréscimo celular e lipídico, indicando que, nesse estágio, os microrganismos podem começar a consumir os lipídeos de suas células devido à escassez de nutrientes.

4.10. Análise Microscópica (estereomicroscópio e microscópio de luz)

As análises microscópicas das amostras foram conduzidas no Laboratório de Microscopia, Morfometria e Identificação (LAMMI), vinculado ao CT-Infra 3 do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Campus Pontal em Ituiutaba – MG.

Todas as imagens foram capturadas utilizando o estereomicroscópio Leica modelo S8 APO (Figura 26) e o Microscópio Nikon Eclipse E200 (Figura 27).

Um estereomicroscópio é um tipo de microscópio óptico projetado para observar objetos tridimensionais com ampliação baixa a moderada. Também conhecido como microscópio de dissecação ou microscópio de zoom, sua característica principal é a capacidade de oferecer uma visão estereoscópica dos objetos. Isso significa que ele é capaz de gerar uma imagem em 3D, permitindo que o observador perceba a profundidade e a estrutura dos objetos em análise (Elisbão & Doge, 2022).

Figura 26 - Lupa eletrônica Leica.



Fonte: próprio autor (2024).

Piazza (2013), apresenta em seu estudo que o estereomicroscópio tem diversas finalidades, como:

- **Observação tridimensional de amostras:** o estereomicroscópio é empregado em diversas áreas da ciência, pesquisa e indústria para examinar objetos ou amostras que possuam relevância tridimensional. Isso inclui a análise de superfícies, estruturas de plantas e insetos, componentes eletrônicos, peças industriais, entre outros;
- **Trabalhos de dissecação:** nas áreas de biologia, o estereomicroscópio desempenha um papel significativo na dissecação de organismos e em estudos de anatomia comparativa. Ele possibilita que os pesquisadores observem detalhes anatômicos sutis e realizem procedimentos de dissecação com alta precisão;
- **Inspeção e montagem industrial:** ele é crucial para a inspeção de peças, montagem de componentes e controle de qualidade, especialmente quando se trata de objetos pequenos e delicados;
- **Sistemas eletrônicos e microeletrônica:** ele é utilizado para trabalhar com placas de circuito impresso, soldagem e inspeção de componentes eletrônicos em pequena escala.

O estereomicroscópio é uma ferramenta inestimável em diversas áreas devido à sua capacidade de proporcionar uma visão tridimensional e ampliada dos objetos em estudo, facilitando a análise, inspeção e manipulação de amostras e objetos diversos. As imagens obtidas pelo estereomicroscópio e pelo microscópio, foram utilizadas para diferentes finalidades, já que as amostras do cultivo apresentam tamanho muito reduzido, sendo

necessária a adoção de ferramentas para a ampliação e verificação de aspectos, como contaminação dos cultivos microbiológicos (Piazza, 2013).

Figura 27 - Microscópio Nikon Eclipse E200



Fonte: próprio autor (2024).

Além de suas diversas aplicações, as imagens possibilitaram a verificação do crescimento e identificação das amostras de *Chlorella* (microalga) e *Oscillatoria* (cianobactéria) nos co-cultivos. Isso é particularmente relevante devido à dificuldade em observar esses indivíduos com instrumentos de menor precisão óptica.

O desenvolvimento das condições de crescimento pôde ser adequadamente registrado, permitindo também a observação e registro da biomassa e do óleo obtidos, utilizando diferentes condições de ampliação e luminosidade.

Para viabilizar uma observação e captura de imagens com ainda maior poder de resolução, foram confeccionadas lâminas temporárias, que foram observadas no Microscópio Nikon Eclipse E200, também no LAMMI (CT-Infra 3/ ICENP/ UFU). Foram obtidas imagens com ampliações de 100x e 400x, possibilitando uma análise de alta resolução para ilustrar as diferentes espécies e demonstrar o desenvolvimento da co-cultura, biomassa e óleo.

4.11. Avaliação e rendimento dos cultivos

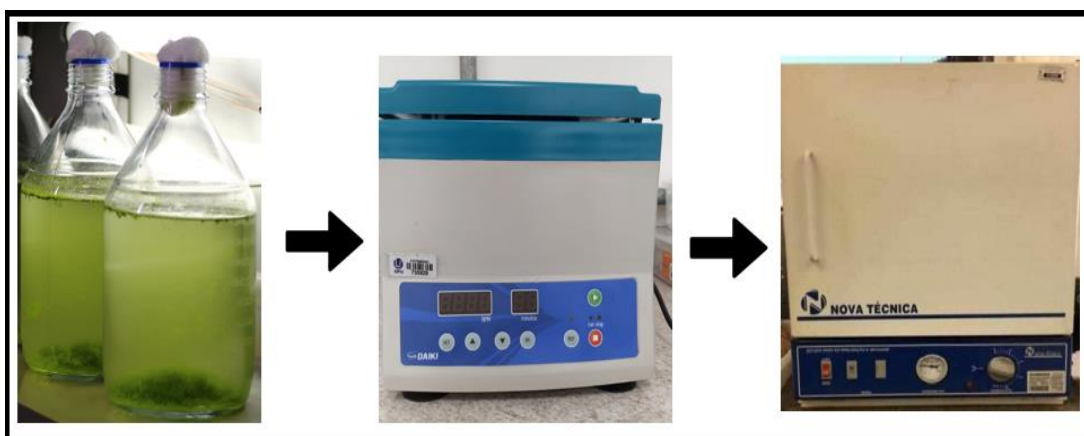
Neste estudo, os parâmetros avaliados foram o rendimento de lipídeos e biomassa seca de microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultivo, após cada experimento. O objetivo principal era investigar as potencialidades do uso da biomassa para produção *in situ* de biodiesel e biochar.

Para comparar a produtividade de lipídeos e biomassa entre os diferentes regimes de cultivo, a microalga *Chlorella* sp. e a cianobactéria *Oscillatoria* sp. foram cultivadas em conjunto em um sistema de co-cultivo. Os microrganismos foram submetidos ao regime de batelada, e todos os experimentos foram conduzidos em ambiente laboratorial com controle rigoroso de luminosidade, nutrientes e aeração, reduzindo assim os riscos de contaminação.

4. 12. Determinação do peso seco da biomassa e quantidade de óleo

Após a conclusão dos dias de cultivo conforme o modelo experimental adotado, as amostras provenientes dos reatores foram integralmente submetidas à centrifugação através do sistema da marca Aaker, empregando um campo centrífugo de 7808g por minuto. Em conformidade com os procedimentos experimentais de Borges (2014), Chiesa (2019) e Oliveira (2019), as amostras foram coletadas e transferidas para um béquer previamente pesado. Todo o material foi submetido a um processo de secagem em estufa a 80°C por 48 horas. Posteriormente, o material foi novamente pesado para determinar a biomassa final, conforme ilustrado na Figura 28.

Figura 28 - Processo de centrifugação e secagem posterior ao co-cultivo de microalgas e cianobactérias depois de 20 dias de cultivo.



Fonte: próprio autor (2024).

As microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura foram retiradas após o processo de centrifugação representada na Figura 29, exibindo a biomassa úmida posterior ao cultivo.

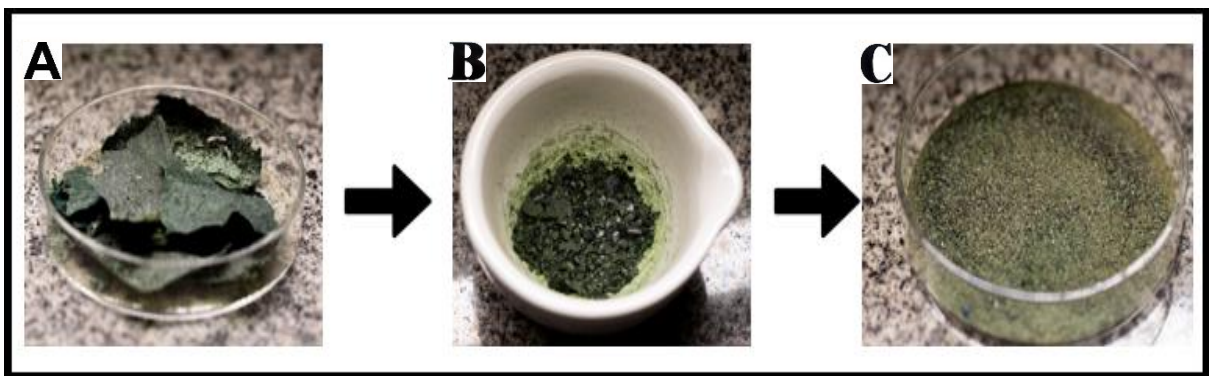
Figura 29 - Biomassa úmida da co-cultura de microalgas e cianobactérias posterior ao processo de centrifugação.



Fonte: próprio autor (2024).

Em seguida, a biomassa das microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultura foi submetida a um processo de maceração, conforme ilustrado na Figura 30. A primeira imagem retrata a biomassa seca após a retirada da estufa, a segunda imagem mostra a biomassa durante o processo de maceração, e a terceira imagem exibe a biomassa totalmente macerada, pronta para a próxima etapa metodológica.

Figura 30 - Biomassa seca co-cultura de microalgas e cianobactérias. (A) Biomassa seca retirada da estufa de secagem. (B) Biomassa seca no processo de maceração (C) Biomassa no final do processo de maceração.



Fonte: próprio autor (2024).

Após a colheita da biomassa, seguida de centrifugação e secagem, a amostra total foi submetida à extração lipídica, conforme a metodologia descrita por Folch, Lees e Stanley (1956). Inicialmente, a biomassa foi macerada em cadinho de porcelana, e posteriormente, foram adicionados 40 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol. A mistura resultante foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL e submetida a um banho ultrassônico (QUIMIS -

Ultrasonic Cleaner 1400, frequência 40 kHz) por 90 minutos cada, visando promover a ruptura celular. Em seguida, a amostra foi centrifugada (conforme ilustrado na Figura 31).

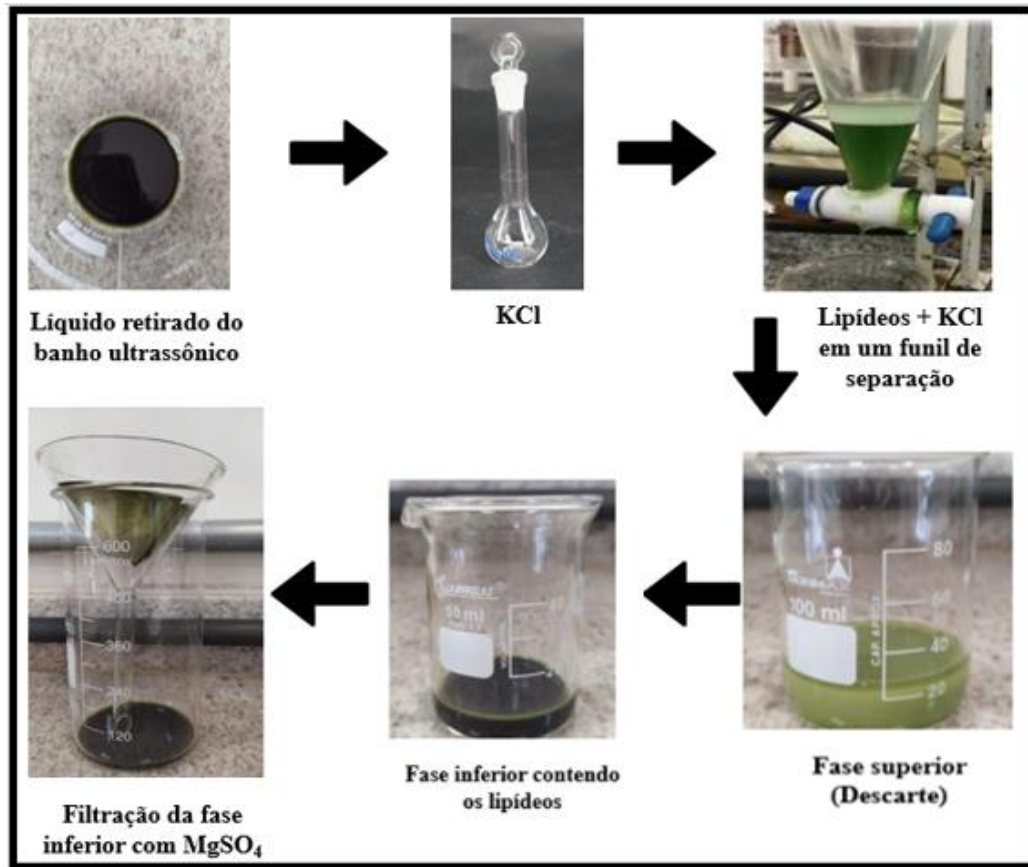
Figura 31 - Procedimento de extração lipídica utilizando banho clorofórmio, metanol, banho ultrassônico e centrifugação utilizando a biomassa seca macerada.



Fonte: próprio autor (2024).

Após os ciclos de centrifugação, que duraram 8 minutos, a parte sólida permaneceu na parte inferior dos tubos, enquanto o sobrenadante contendo lipídios foi transferido para um béquer de 200 mL, contendo 6 mL de solução KCl 0,088%. Esta mistura foi agitada e transferida para um funil de separação. Após a formação das duas fases, 4 mL de uma mistura metanol/água na proporção de 1:1 foram adicionados à fase contendo os lipídios. O funil foi submetido a uma nova agitação, e a fase superior foi removida por sucção usando uma pipeta graduada e descartada. A fase inferior, que continha os lipídios, foi filtrada com sulfato de magnésio. Em seguida, foi transferida para um balão volumétrico, posicionado sob uma capela para a completa evaporação dos solventes (conforme mostrado na Figura 32).

Figura 32 - Procedimento de extração lipídica utilizando KCl, Metanol e água destilada, posterior agitação e separação para filtração com $MgSO_4$.



Fonte: próprio autor (2024).

O óleo extraído das células das microalgas e cianobactérias em um sistema de co-cultivo por 21 dias é apresentado na Figura 33.

Figura 33 - Lipídeos extraídos da co-cultura de microalgas e cianobactérias a partir do método de Folch (1956).



Fonte: próprio autor (2024).

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

$$TL = \frac{MO \cdot 100}{MB} \quad (1)$$

Onde o *TL*, representa o teor de lipídeos, expresso em porcentagem (%), *MO* indica a massa de óleo produzida, expressa em gramas (g), e *MB* refere-se à massa da biomassa presente em 1 litro de meio de co-cultura, medida em gramas por litro (g/L).

4.13. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é uma ferramenta que utiliza feixes de elétrons para gerar imagens de alta resolução da superfície de objetos em escala microscópica. Sua principal finalidade é a visualização detalhada da topografia e morfologia das amostras, permitindo análises precisas em diversas áreas, como ciências biológicas, ciência dos materiais, nanotecnologia e geologia (Girão-Carmona, Silva & Melo, 2020).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o propósito de observar a morfologia da superfície do material, permitindo visualizar a forma, o tamanho e a textura das partículas. O teste foi conduzido utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Compacto JEOL JSM-6010LA, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do ABC, no Campus Santo André – SP. Para a análise, as amostras foram fixadas ao porta-amostras com fita de carbono, submetidas à aplicação de uma monocamada de ouro utilizando o metalizador BAL-TEC, modelo SCD 005, e posteriormente examinadas.

4.14. Reprodutibilidade dos experimentos

Com o objetivo de avaliar as condições ideais de cultivo com base nas respostas do planejamento de experimentos Doehlert, foram realizados três novos cultivos para investigar as variáveis relacionadas à quantidade de biomassa, quantidade de óleo e rendimento lipídico. Para esses novos co-cultivos, houve alterações em três nutrientes do meio de cultivo: fosfato, zinco e nitrato. Um novo meio de cultivo foi preparado com valores atualizados para fosfato, nitrato e zinco, em valores diferentes para rendimento de óleo e biomassa. Enquanto os demais micro e macronutrientes foram mantidos conforme Hakalin (2014). Posteriormente, a biomassa foi centrifugada e seca, seguindo as metodologias empregadas por Oliveira (2019),

Chiesa (2019) e Borges (2014). A extração lipídica foi realizada conforme o método estabelecido por Folch, Lees e Stoane-Stanley (1956), visando determinar a quantidade de óleo e o teor lipídico.

4.15. Adição de vitaminas ao meio de cultivo na co-cultura de microalgas e cianobactérias visando rendimento de óleo e biomassa

Com o objetivo de investigar o impacto da incorporação de vitaminas no meio de cultivo da co-cultura entre microalgas e cianobactérias para aumentar a produção de lipídeos e biomassa, foram introduzidas vitaminas conforme descrito por Borges (2014) e Chiesa (2019), conforme apresentado na Tabela 7. Após a preparação da solução estoque de vitaminas, 1 mL dessa solução foi adicionado a cada 1000 mL de meio de cultivo. Os experimentos foram conduzidos sob as mesmas condições operacionais utilizadas anteriormente, e as análises foram realizadas ao longo de um período de 21 dias.

Tabela 7 - Composição de vitaminas inseridas no meio de cultivo da co-cultura entre microalgas e cianobactérias.

Solução	Reagente utilizado	Concentração da solução estoque (mg/L)
Vitaminas (1 mL/L de meio)	Tiamina (B1)	100
	Cianocobalamina (B12)	0,5
	Biotina (B7)	0,5

Fonte: próprio autor adaptado de Borges (2014) e Chiesa (2019).

4.15.1. Estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo

Foram testadas diferentes concentrações das vitaminas com o objetivo de otimizar o desempenho para uma maior produção de lipídios e biomassa. As condições operacionais permaneceram semelhantes às utilizadas nos testes anteriores.

Nos experimentos com vitaminas, as concentrações de cada vitamina (B1, B12 e B7) foram ajustadas, seguindo as diretrizes de Borges (2014) e Chiesa (2019), visando identificar se alguma alteração nas concentrações dessas vitaminas poderia resultar em melhorias na produção de lipídios e biomassa, tanto individualmente quanto em conjunto.

Foram conduzidos 24 experimentos, variando as concentrações das vitaminas nas seguintes condições: ausência de uma vitamina específica, metade da concentração,

concentração padrão/normal e o dobro da concentração indicada na Tabela 8, que se refere à solução estoque utilizada na preparação do meio de cultivo. Os detalhes sobre a concentração de cada vitamina durante os experimentos estão descritos na Tabela 8.

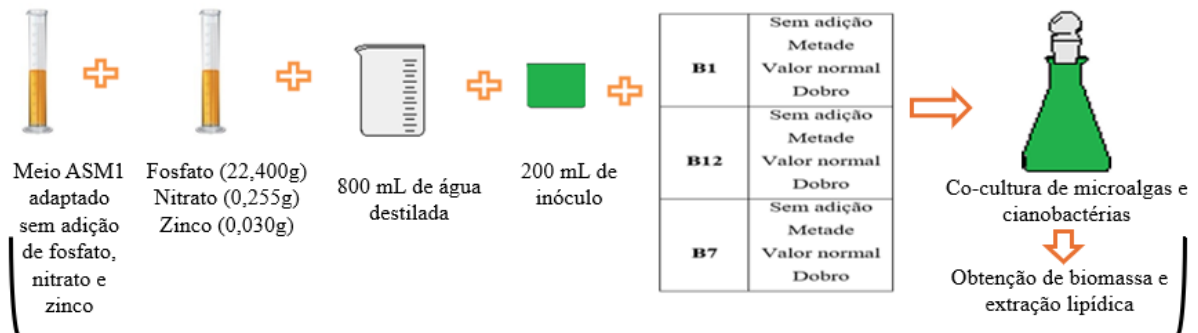
Tabela 8 - Concentração das vitaminas testadas.

Vitamina	Condição	Nova concentração na solução estoque (mg/L)
Tiamina (B1)	Sem adição	0
	Metade	50
	Valor normal	100
	Dobro	200
Cianocobalamina (B12)	Sem adição	0
	Metade	0,25
	Valor normal	0,50
	Dobro	1,00
Biotina (B7)	Sem adição	0
	Metade	0,25
	Valor normal	0,50
	Dobro	1,00

Fonte: Fonte: próprio autor (2024) adaptado de Borges (2014).

Dos 24 experimentos, 12 estão relacionados no estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo para a obtenção de lipídeos, enquanto os outros 12 investigaram a variação das concentrações de vitaminas para a obtenção de biomassa, conforme ilustrado nas Figuras 34 e 35.

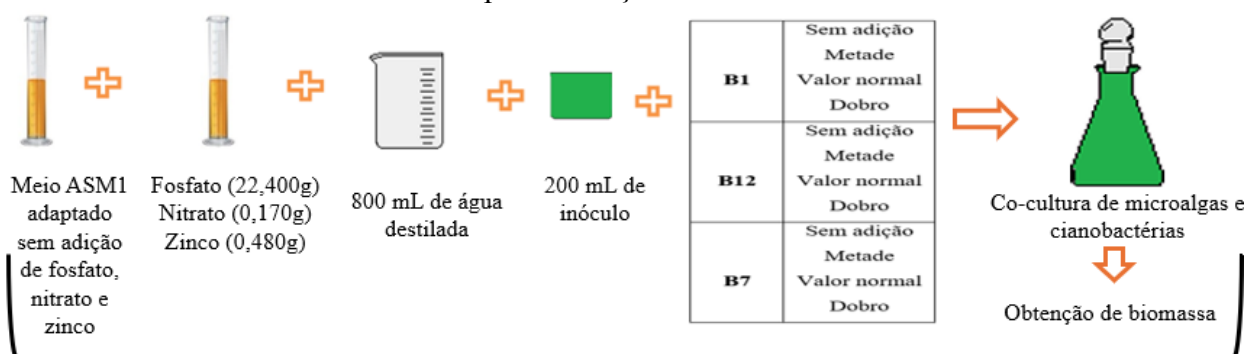
Figura 34 – Esquema do estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo para obtenção de lipídeos.



- Condições de cultivo:
- Presença de aeração;
 - 21 dias de cultivo;
 - Cultivo em batelada;
 - 12 horas de iluminação/ 12 horas de escuro;
 - Tipo de reator: frascos de vidro boro 3.3 graduados.

Fonte: próprio autor (2024).

Figura 35 – Esquema do estudo da variação das concentrações de vitaminas no meio de cultivo para obtenção de biomassa



- Condições de cultivo:
- Presença de aeração;
 - 21 dias de cultivo;
 - 12 horas de iluminação/ 12 horas de escuro;
 - Tipo de reator: frascos de vidro boro 3.3 graduados.

Fonte: próprio autor (2024).

4.16. Caracterização da biomassa seca (Análise imediata)

A análise imediata foi realizada com o objetivo de identificar as propriedades significativas de umidade, cinzas e voláteis da co-cultura entre microalgas e cianobactérias. Todas essas avaliações seguiram as diretrizes da ASTM – *American Society for Testing and Materials*. Todas as análises foram realizadas nas instalações do Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

4.16.1. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado utilizando o método da estufa, conforme a metodologia descrita por Veloso (2017) e Barbosa (2020), com alterações. Nesse procedimento experimental, 1g da amostra foi colocado em um cadinho previamente seco e tarado. O cadinho contendo a amostra foi colocado na estufa a 105°C por 2 horas, resfriado e novamente pesado ao atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foi mantido na estufa a 105°C por mais uma hora, repetindo esse ciclo até que a massa se estabilizasse. O teor de umidade foi determinado pela Equação 3.1:

$$U (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i - m_p} \cdot 100 \quad (3.1)$$

Nesta equação, U representa o teor de umidade, m_i representa a massa inicial do conjunto (amostra + placa), m_f indica a massa final, e m_p se refere à massa da placa de Petri.

4.16.2. Teor de voláteis

A determinação do teor de voláteis foi realizada seguindo o método ASTM E872-82, conforme a metodologia descrita por Veloso (2017) e Barbosa (2020). A amostra foi colocada em uma mufla e exposta a uma temperatura de 950°C por 7 minutos, utilizando um cadinho com tampa. O teor de voláteis foi calculado de acordo com as Equações 3.2 e 3.3.

$$Pm (\%) = \frac{m_i - m_f \cdot 1}{m_i - m_c} \cdot 100 \quad (3.2)$$

$$V (\%) = Pm (\%) - U (\%) \quad (3.3)$$

Nesta equação, Pm representa a perda de massa, m_i refere-se à massa inicial do conjunto (amostra + cadinho), m_f indica a massa final, m_c representa a massa do cadinho, e V representa o teor de voláteis.

4.16.3. Cinzas

A quantificação do teor de cinzas foi realizada conforme a metodologia descrita por Veloso (2017) e Barbosa (2020), utilizando o método ASTM E1534-93. Neste procedimento, a amostra foi aquecida em uma mufla a 700°C por 4 horas. Após o resfriamento em um dessecador, o conjunto foi pesado, e o teor de cinzas foi calculado conforme a Equação 3.4:

$$Cz (\%) = \frac{m_f - m_c}{m_i - m_c} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Nessa equação, Cz representa o teor de cinzas, m_i é a massa inicial do conjunto (amostra + cadinho), m_f é a massa final (cinzas + cadinho), e m_c refere-se à massa do cadinho.

4.16.4. Carbono fixo

O teor de carbono fixo foi calculado por diferença, utilizando as análises e resultados anteriores de voláteis e cinzas (Equação 3.5), conforme o método ASTM Standard D3172 e utilizado por Veloso (2017) e Barbosa (2020).

Equação 3.5:

$$Cf (\%) = 100 - V (\%) - Cz (\%) \quad (3.5)$$

Nesta equação, C representa o teor de carbono fixo, V representa o teor de voláteis, e Cz representa o teor de cinzas.

4.17. Análise Elementar (AE)

A análise elementar tem como objetivo principal determinar a composição quantitativa de elementos de uma substância ou amostra, fornecendo informações cruciais sobre a presença e a quantidade de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e, em alguns casos, oxigênio. Essa técnica é fundamental para diversas aplicações, desde a identificação da pureza de compostos e controle de qualidade industrial até a pesquisa científica e o desenvolvimento de novos materiais (Farinha, 2020).

As composições elementares das amostras de biomassa da co-cultura, tanto antes quanto após o processo de extração lipídica, foram avaliadas utilizando um analisador elementar Perkin Elmer (Série II CHNS / S - 2400). Aproximadamente 3 mg de cada amostra

foram pesados em uma microbalança acoplada ao aparelho. Todas as análises foram realizadas nas instalações dos Laboratórios do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da UFVJM.

Os valores de oxigênio (O), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) foram determinados em um teste realizado com uma amostra de 3 mg. O teor de oxigênio foi calculado por diferença conforme a Equação 3.6:

$$O (\%) = 100 - (C (\%) + H (\%) + N (\%) + S (\%) + \text{cinzas}) \quad (3.6)$$

4.18. Análise Termogravimétrica (TGA)

O Analisador Termogravimétrico (ATG ou TGA, do inglês Thermogravimetric Analyzer) é um dispositivo utilizado na análise térmica para medir a variação da massa de uma amostra em relação à temperatura ou ao tempo. Essa técnica é essencial em várias áreas da ciência e da indústria, como química, materiais, farmacêutica, alimentos e polímeros. Seu princípio de funcionamento envolve registrar a variação da massa da amostra enquanto ela é aquecida, em uma atmosfera inerte, geralmente nitrogênio ou argônio, ou em uma atmosfera específica, como ar, oxigênio ou outro gás. A amostra é colocada em um crisol dentro da câmara de análise do ATG, que é mantida em um ambiente de temperatura controlada. O sistema registra a variação de massa da amostra durante o aquecimento (Ramos, 2020).

O analisador termogravimétrico é uma ferramenta que ajuda na caracterização e compreensão de materiais e reações químicas, desempenhando um papel crucial em pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade em diversas áreas da ciência e da indústria (Ramos, 2020).

A estabilidade térmica e o perfil termogravimétrico das amostras de biomassa da co-cultura, tanto puras quanto acetiladas, juntamente com os eventos que desencadeiam a variação da massa dos materiais com o aumento da temperatura, foram analisados por meio da técnica de análise termogravimétrica. Todos os experimentos foram conduzidos utilizando um Analisador Termogravimétrico modelo TGA 55, da TA Instruments. Em cada análise, aproximadamente 5 mg de biomassa da co-cultura foram aquecidos em um suporte de platina de alta temperatura (Pt-HT), variando de 10° a 600°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera inerte e em ar sintético (com execução separada para amostras distintas). A representação gráfica foi elaborada utilizando o software Origin® 2018 –

Graphing & Analysis. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia, CT-Infra 3, Campus Pontal – Ituiutaba – MG.

4.19. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) é uma técnica analítica empregada para a identificação e análise da estrutura molecular de substâncias, com base na absorção de luz infravermelha. A região do infravermelho abrange comprimentos de onda mais extensos do que a luz visível, dividindo-se em três faixas principais de frequência. A técnica fundamenta-se na absorção de radiação infravermelha por moléculas em frequências específicas, relacionadas a vibrações moleculares como vibrações de ligação e rotações. Essas absorções ocorrem em diferentes comprimentos de onda, fornecendo informações sobre a caracterização de substâncias e a identificação de grupos funcionais nas moléculas (Pacheco, 2022).

A técnica de espectroscopia no infravermelho é altamente eficaz na identificação das funções químicas presentes em amostras, tanto puras quanto em misturas. Essa abordagem possibilita uma análise qualitativa e quantitativa dos modos vibracionais em compostos orgânicos e inorgânicos (AUD, 2022). O objetivo específico desta técnica foi avaliar o perfil da biomassa proveniente da co-cultura de microalgas e cianobactérias, tanto na forma pura quanto acetilada, além de examinar o óleo produzido por suas células.

As análises por espectroscopia de absorção na região do infravermelho foram conduzidas com 128 varreduras de transmitância, utilizando o espectrofotômetro Jasco modelo 4100 (Tóquio, Japão). Todos os experimentos foram executados nas instalações do Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Pontal – LEMUP, em Ituiutaba, MG.

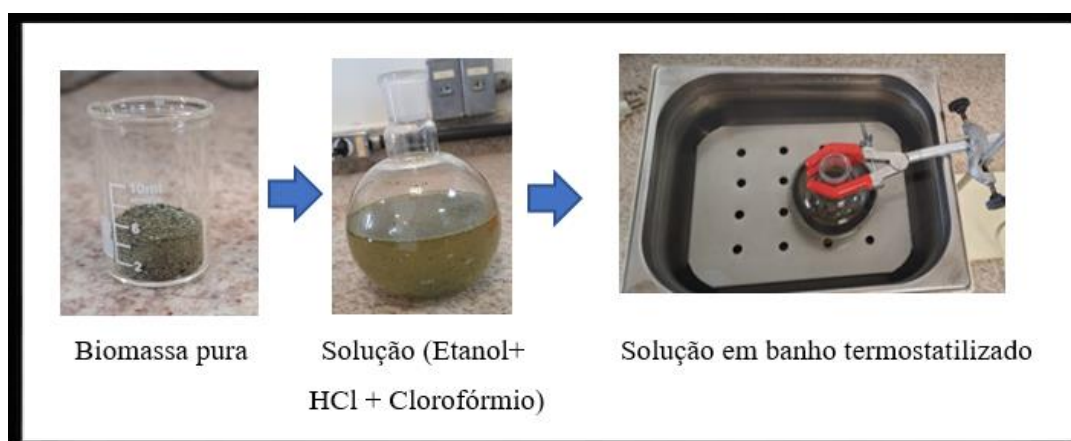
4.20. Produção de ésteres utilizando a reação *in situ*

A síntese de ésteres através da transesterificação ácida *in situ* seguiu o procedimento metodológico descrito por Lewis et al. (2000) para a síntese de ésteres alquílicos, conforme ilustrado na Figura 36.

Inicialmente, a obtenção da biomassa macerada pura ocorreu após o processo de secagem. A biomassa resultante foi pesada (2,25 g) e transferida para um balão de fundo

chato de 500 mL. Em seguida, em um balão volumétrico, foram adicionados 324,95 mL de uma solução contendo etanol, catalisador (HCl) e solvente (clorofórmio) na proporção de 10:1:1 (v/v/v). Uma agitação manual foi realizada para garantir que a biomassa permanecesse suspensa na solução. Posteriormente, a solução foi submetida a um banho termostatizado a 60°C por 120 minutos.

Figura 36 - Reação de transesterificação ácida *in situ*.



Fonte: próprio autor (2024).

Após o tempo de reação, o balão foi removido do banho e resfriado até atingir a temperatura ambiente, utilizando água gelada. Em seguida, a solução resultante foi transferida para um funil de separação, ao qual foram adicionados 30 mL de água deionizada, seguidos por 60 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio na proporção de 4:1 (v/v), sendo agitado manualmente.

Após esse procedimento, ocorreu a separação de fases, com o material orgânico localizado na parte superior sendo recolhido e depositado em um béquer. Subsequentemente, o material foi colocado sob uma capela para permitir a completa evaporação do solvente. Posteriormente, o material foi submetido a análises analíticas.

5. RESULTADOS

5.1. Testes preliminares

Nesta seção, serão apresentados os resultados dos testes preliminares conduzidos na co-cultura de microalgas (*Chlorella* sp.) e cianobactérias (*Oscillatoria* sp.). Em seguida, foram realizados experimentos com a co-cultura para avaliar sua capacidade de adaptação a um novo meio de cultivo, a produção de biomassa, a quantidade de óleo gerada e o teor de lipídeos.

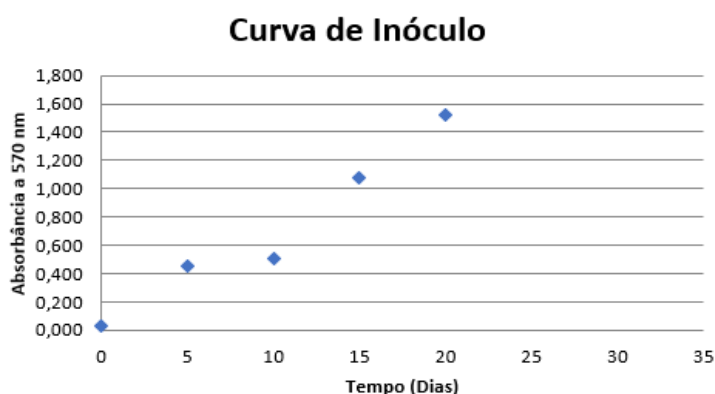
5.1.1. Geração de biomassa a partir do crescimento celular

Para avaliar o crescimento celular, empregou-se o método de espectrofotometria de absorção na faixa visível. A produção de biomassa foi acompanhada através do comprimento de onda de 570 nm, amplamente utilizado em estudos de crescimento celular envolvendo microrganismos como microalgas e cianobactérias.

As leituras de absorbância foram realizadas com o cuidado de refletir com precisão a aparência real dos reatores individuais. O monitoramento do crescimento das microalgas e cianobactérias ocorreu nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, com o intuito de observar o desenvolvimento celular em dias alternados.

A Figura 37 ilustra a curva de crescimento celular em um co-cultivo de microalgas e cianobactérias após 21 dias de cultivo, com 20% de inóculo (200 mL) em 1L de meio total, indicando a proporção de 200 mL de inóculo com microalgas e 800 mL de água destilada.

Figura 37 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga *Chlorella* sp. em um sistema de co-cultivo com uma espécie de cianobactéria *Oscillatoria* sp. em 21 dias de cultivo (Ensaio 1).



Fonte: próprio autor (2024).

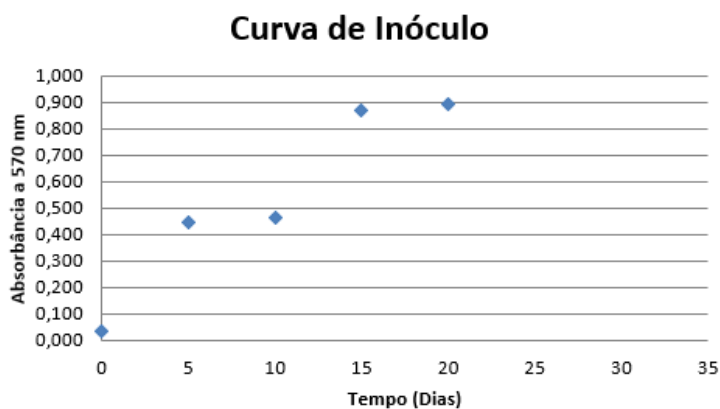
As leituras de absorvância nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 foram, respectivamente, 0,027; 0,451; 0,503; 1,075 e 1,525. Esses valores indicam que a co-cultura demonstra uma adaptação eficaz ao meio de cultivo ASM1 (Santos, 2016) e dessa forma, apresentam uma interação satisfatória entre as espécies de microalgas e cianobactérias.

Os dados apresentados na Figura 37 apresentam que as fases exponenciais do co-cultivo ocorreram nos períodos de 0 a 5 dias e de 10 a 20 dias. Pesquisas anteriores de Rós (2012) exibem valores semelhantes para diversas espécies de cianobactérias cultivadas em meios distintos, onde a autora buscou identificar as condições nutricionais mais adequadas para diferentes cepas de cianobactérias.

Os valores obtidos, comparáveis aos estudos anteriores de Rós (2012) ainda mostram que em diferentes cepas de cianobactérias, corroboram a consistência da resposta da co-cultura diante de variações no meio de cultivo. Essa semelhança sugere que as condições nutricionais identificadas por Rós para cianobactérias podem ser aplicáveis e influenciar positivamente o desempenho da co-cultura de microalgas e cianobactérias.

A Figura 38 representa a curva de crescimento celular em um co-cultivo de microalgas e cianobactérias, mantendo as condições de cultivo do ensaio 1. A repetição deste experimento foi conduzida para aprofundar a compreensão da relação entre microalgas e cianobactérias em uma contaminação aleatória, assim como suas relações existentes entre biomassa e lipídeos.

Figura 38 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga *Chlorella* sp. em um sistema de co-cultivo com uma espécie de cianobactéria *Oscillatoria* sp. 21 dias de cultivo (Ensaio 5).



Fonte: próprio autor (2024).

As medições de absorvância nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 registraram valores de 0,035; 0,447; 0,461; 0,871 e 0,889, respectivamente. Estes resultados indicam uma leve diferença em comparação com as leituras de absorvância do primeiro experimento. Esse fenômeno, conforme observado por Zhu *et al.* (2019) em sua pesquisa, revela variações nas observações entre culturas mono e co-culturas de microalgas. No estudo, reatores originados de inóculos apresentaram leituras de absorvância divergentes, assim como quantidades discrepantes de biomassa. Essas discrepâncias podem sugerir adaptações irregulares, onde a presença desigual de uma espécie em um reator, em comparação com outro, pode influenciar a produção total de biomassa e, conseqüentemente, resultar em rendimentos distintos de lipídeos na co-cultura.

Os resultados comparados com os estudos de Zhu *et al.* (2019) sugerem que reatores provenientes dos mesmos inóculos podem manifestar comportamentos distintos ao longo do tempo. Essa heterogeneidade nas leituras de absorvância e na quantidade de biomassa pode indicar a presença de dinâmicas específicas de cada reator, com possíveis influências de fatores microambientais locais ou adaptações específicas das culturas.

É relevante destacar que tais diferenças podem ter implicações significativas na produção total de biomassa e nos rendimentos de lipídeos na co-cultura. Essa variabilidade precisa ser considerada ao avaliar o desempenho do sistema, ressaltando a importância de estudos mais aprofundados para compreender as interações entre as espécies e otimizar as condições de cultivo para alcançar resultados mais consistentes e previsíveis.

5.1.2. Comportamento da microalga *Chlorella* sp. e cianobactéria *Oscillatoria* sp. em um sistema de co-cultura em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo

Realizou-se 5 ensaios para obter os valores de rendimento de óleo, biomassa seca, e quantidade de óleo produzida por reator, estes valores são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa em um sistema de co-cultivo de microalgas e cianobactérias.

Ensaio	Biomassa seca (g/L)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)	Teor de lipídeos extraído das células (%)
1	0,9728	0,0603	6,20
2	0,1834	0,0203	11,06
3	0,6154	0,1220	9,78
4	0,2834	0,0260	9,17
5	0,1489	0,0187	12,56

Fonte: próprio autor (2024).

Conforme destacado por Borges (2014) e Oliveira (2019), teores de lipídeos superiores a 10%, extraídos das células, são considerados aceitáveis, especialmente quando há uma otimização nos processos de cultivo de microalgas. Para as cianobactérias, esses valores são considerados satisfatórios, embora ainda requeiram ajustes para aprimorar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

A busca por teores de lipídeos acima de 10% nas células de microalgas e cianobactérias fundamenta-se na importância desse componente para a produção de biocombustíveis. Lipídeos, como óleos e gorduras, são matérias-primas valiosas para a fabricação de biocombustíveis, como biodiesel. Assim, valores superiores a 10% indicam um potencial significativo para a produção eficiente desses biocombustíveis.

As pesquisas de Cordeiro (2015) e Souza (2018) indicam que diversas espécies de cianobactérias apresentam notável capacidade de armazenamento lipídico, tornando-as candidatas ideais para a produção de diversos tipos de biocombustíveis. Alguns autores apresentam resultados comparáveis aos dados apresentados, como 11,10% para a espécie *Romeria gracilis* (Ensaio 2), 11,22% para a espécie *Calothrix* sp. (Ensaio 2), 10,30% para a espécie *Aphanothece* sp. (Ensaio 3) e 12,20% para a espécie *Mysosarcina* sp. (Ensaio 5).

Esses teores lipídicos podem ser otimizados por meio de planejamentos experimentais que considerem condições de cultivo específicas e quantidades variadas de micro e

macronutrientes, como apresentado por Souza (2018). Essa abordagem experimental possibilita um aumento controlado nos teores de lipídeos, fornecendo uma base para aprimorar a eficiência na produção de biocombustíveis a partir desses organismos.

5.2. Geração de biomassa a partir do crescimento celular

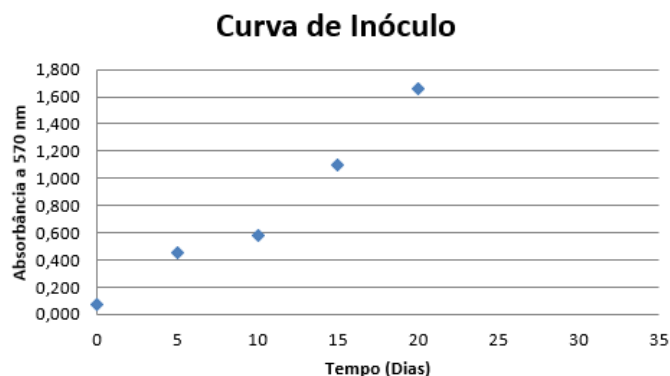
Realizou-se a avaliação do crescimento celular das co-culturas, empregando o método de espectrofotometria na região do visível para acompanhar a produção de biomassa das microalgas e cianobactérias. Este método é amplamente utilizado na verificação da produtividade em estudos que envolvem tanto microalgas quanto cianobactérias, abrangendo diferentes espécies deste reino.

As leituras de absorbância foram conduzidas com precaução para evitar resultados discrepantes, garantindo que as amostras refletissem fielmente a aparência real de cada reator. O monitoramento foi realizado por meio de leituras nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, visando observar o crescimento celular.

A Figura 39 exibe o crescimento celular da co-cultura de microalgas e cianobactérias ao longo de 21 dias, alcançando a fase estacionária. Tanto para cianobactérias quanto para microalgas, existem fases distintas no crescimento dos microrganismos do reino Protista, conforme descrito por Souza (2018) e Santos (2016). Esses autores explicam que a primeira fase nesse tipo de cultivo é a fase de adaptação fisiológica às novas condições, conhecida como fase lag. A segunda fase, chamada de fase log, inicia-se por volta do 3º dia de cultivo, quando as condições são propícias à vida, marcando o início de uma reprodução mais significativa. A terceira e última fase, a fase estacionária, geralmente ocorre para a maioria das cianobactérias e microalgas a partir do 22º dia de cultivo. Nessa fase, os nutrientes do meio foram praticamente todos consumidos, a reprodução desacelera significativamente, e, se o cultivo não for interrompido, os microrganismos começam a utilizar os lipídeos como fonte energética para suas atividades bioquímicas básicas, seguidos pelos carboidratos presentes em suas células.

O entendimento das distintas fases de crescimento celular nas co-culturas de microalgas e cianobactérias é fundamental para otimizar a produção e compreender os padrões comportamentais desses microrganismos. A compreensão dessas fases é crucial para planejar estratégias de cultivo, visando maximizar a produção de biomassa e lipídeos, elementos essenciais para aplicações biotecnológicas e de pesquisa em biocombustíveis.

Figura 39 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga *Chlorella* sp. em um sistema de co-cultivo com uma espécie de cianobactéria *Oscillatoria* sp. (Ensaio 4).



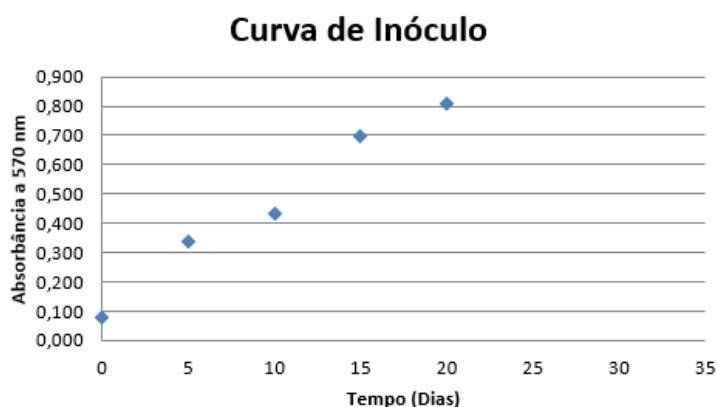
Fonte: próprio autor (2024).

É fundamental compreender minuciosamente esses mecanismos e subsequente otimização, visto que o objetivo do trabalho é maximizar o rendimento lipídico e de biomassa das células para a produção de biodiesel e biochar, que requer a obtenção do máximo teor lipídico das células. As leituras de absorvância nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 foram, respectivamente, 0,075; 0,451; 0,576; 1,097 e 1,658. A partir da absorvância, foi possível observar o crescimento celular ao longo do tempo de cultivo. A Figura 48 revela que nos primeiros dias ocorre a adaptação ao meio de cultivo, bem como às condições de luminosidade, reator e aeração, promovendo uma maior disponibilidade de nutrientes em contato com os microrganismos.

Todas as leituras exibem valores crescentes, indicando uma adequada adaptação às condições laboratoriais estabelecidas para este cultivo e uma interação ecológica positiva até o momento, no que diz respeito ao crescimento celular entre microalgas e cianobactérias. Os valores de absorvância na Figura 48 são bastante semelhantes aos estudos de Chiesa (2019), que realizou cultivos da microalga *Chlorella* sp. com o propósito de obter rendimento lipídico, Borges (2014) com o cultivo da microalga *Spirulina platenses*, também visando rendimento lipídico, e Cordeiro (2015) com a cianobactéria *M. protocyttis*, utilizando o mesmo meio de cultivo deste estudo e com o intuito de produzir diversos biocombustíveis.

A Figura 40 apresenta valores crescentes em todas as leituras de absorvância nas datas programadas para a verificação do crescimento celular, evidenciando as mesmas características observadas na Figura 48 em relação ao crescimento celular exponencial na fase log.

Figura 40 - Curva de absorvância para crescimento celular da microalga *Chlorella* sp. em um sistema de co-cultivo com a cianobactéria *Oscillatoria* sp. (Ensaio 12).



Fonte: próprio autor (2024).

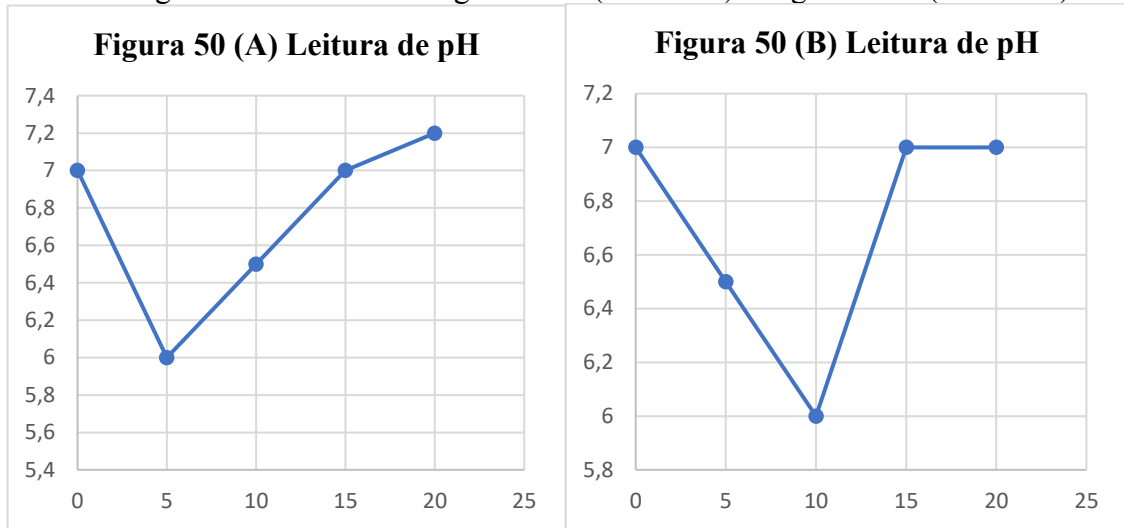
As medições de absorvância nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 foram, respectivamente, 0,077; 0,339; 0,431; 0,696 e 0,810. Estudos anteriores conduzidos por Cartas (2018) e Borges (2014) apresentam valores comparáveis aos exibidos na Figura 49, utilizando a espécie de microalga *Chlorella* sp., Cordeiro (2015) analisou as espécies de cianobactéria *M. protoctyis* e *M. aeruginosa* (cultivadas no meio ASM1), enquanto Souza (2018) investigou a espécie de cianobactéria *A. brasiliense*, ambos demonstrando resultados similares.

As discrepâncias entre os dois biorreatores são atribuídas às condições nutricionais estabelecidas no planejamento experimental, que indicam cultivos com diferentes níveis de zinco, fosfato e nitrato. Ao final do experimento, as leituras de absorvância revelam uma diferença significativa de 0,848 no 20º dia, indicando que o ensaio 4 provavelmente apresentará um rendimento de biomassa superior ao do ensaio 12.

5.3. Impacto no pH do meio de cultivo

Ao longo do cultivo da co-cultura de microalgas, não foram efetuadas correções no pH do meio, porém, seis valores foram regularmente registrados durante seu desenvolvimento, como mostra a Figura 41. O pH é influenciado por diversos fatores, como a composição e capacidade tamponante do meio, a quantidade de dióxido de carbono dissolvido, a atividade metabólica das células e a temperatura (que afeta a solubilidade do CO₂). A variação do pH em co-culturas de microalgas e cianobactérias resulta do consumo de substratos, da solubilização e consumo de dióxido de carbono, e da degradação de metabólitos produzidos (Pepino, 2011).

Figura 41 - Leitura de pH em relação ao tempo de cultivo da co-cultura de microalgas e cianobactérias. Figura 50-A (Cultivo 1) e Figura 50-B (Cultivo 2).



Fonte: próprio autor (2024).

Na Figura 41-A, é possível notar que as leituras de pH foram realizadas nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, apresentando valores de 7,0; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,2, respectivamente. Já na Figura 50-B, as leituras ocorreram nos mesmos dias, registrando valores de 7,0; 6,5; 6,0; 7,0 e 7,0. Observa-se semelhanças entre os dois gráficos, indicando uma diminuição nos valores (ligeiramente ácidos) nos primeiros dias de cultivo, seguida por uma regulação do pH que retorna ao estado neutro.

A análise do pH ao longo do tempo fornece uma compreensão valiosa sobre a dinâmica do ambiente de cultivo da co-cultura entre microalgas e cianobactérias. O pH é um parâmetro crucial, influenciando diretamente a disponibilidade de nutrientes, a atividade enzimática e, conseqüentemente, o desenvolvimento e metabolismo das microalgas e cianobactérias.

Observa-se nas Figuras 41-A e 41-B uma variação nos valores de pH nos primeiros dias do cultivo. Esse decréscimo inicial pode ser atribuído a vários fatores, como o consumo de nutrientes pelas células em crescimento, a produção de metabólitos ácidos e a absorção de dióxido de carbono. A resposta ácida inicial pode ser interpretada como um indicativo das atividades metabólicas iniciais das microalgas e cianobactérias.

No entanto, é interessante notar que, posteriormente, o pH se estabiliza e retorna a valores mais próximos à neutralidade. Esse fenômeno sugere uma autorregulação do sistema, onde os processos metabólicos das microalgas e cianobactérias se ajustam para manter as condições ideais de crescimento. A neutralização gradual do meio pode estar associada à

liberação de metabólitos básicos ou ao equilíbrio entre a absorção e produção de ácidos e bases.

Essas observações fornecem uma compreensão mais profunda da interação dinâmica entre as microalgas e cianobactérias e o meio de cultivo, sendo essencial para otimizar as condições de crescimento e maximizar a produção de biomassa e compostos desejados. Além disso, a monitorização contínua do pH fornece informações valiosas para ajustar estratégias de controle ambiental e melhorar o desempenho geral do cultivo.

Pepino (2011), apresenta em seus estudos com a microalga *Scenedesmus* sp. que os valores do pH também existem uma relação de acidificação do meio de cultivo nos primeiros dias. Após o 5º dia de cultivo, quando a microalga entra em fase log, e com a redução gradual de nutrientes, produtos de solubilização do CO₂ e a retirada do CO₂ pela fotossíntese o pH começa a subir tendendo ao equilíbrio.

5.4. Análise microscópica das co-culturas

Uma das áreas que merece destaque nas Ciências Biológicas é a microbiologia, um campo de estudo dedicado à investigação de microrganismos por meio de diversos tipos de microscópios. A revolução proporcionada pelo microscópio foi crucial para o avanço do conhecimento científico, permitindo-nos explorar e examinar áreas que anteriormente eram desconhecidas. O que antes não era perceptível a olho nu passou a ser minuciosamente analisado através das lentes do microscópio (HALMENSCHLAGER *et al.*, 2019).

5.4.1. Identificação da co-cultura

Após a ocorrência de contaminação em um fotobiorreator, durante a pandemia da COVID-19 tornou-se preciso identificar as microalgas ou cianobactérias presentes na co-cultura. As investigações foram conduzidas no Laboratório de Microscopia, Morfometria e Identificação (LAMMI), onde são mantidas diversas espécies de microalgas e cianobactérias, incluindo:

- **Microalga** *Chlorella* sp.

A cepa da microalga foi gentilmente disponibilizada pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara (ILES/ULBRA), do Curso de Graduação em Química no Campus Itumbiara. Anteriormente, essa mesma microalga foi cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT).

- **Cianobactéria** *Oscillatoria* sp.

A cianobactéria em questão do gênero *Oscillatoria*, foi cedida gentilmente pelo LabMBio e LabBBio da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

A identificação das microalgas e cianobactérias foi conduzida com base em imagens compartilhadas com grupos de pesquisa por meio de uma colaboração estabelecida com o Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri (UFVJM), localizado no Campus Diamantina, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. Além disso, essa parceria envolveu a colaboração com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), especificamente o curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia no Campus Dois Vizinhos.

A partir das preparações das lâminas temporárias e placas de petri, as imagens foram feitas pelo estereomicroscópio Leica modelo S8 APO e o Microscópio Nikon. Por meio dessas lâminas, foi possível constatar a coexistência das duas espécies distintas no co-cultivo (*Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp.), além da formação de massas resultantes do adensamento de células da microalga, com os filamentos das cianobactérias envolvidos por uma bainha mucilaginosa.

5.4.2. Microscópio de luz

As imagens capturadas pelo microscópio de luz desempenharam um papel crucial na detecção inicial de contaminação na cultura, permitindo a identificação de microalgas e cianobactérias a nível de gênero. As análises microscópicas foram de extrema importância devido ao tamanho diminuto das amostras de cultura, exigindo a aplicação de ferramentas para ampliação e exame detalhado das estruturas celulares.

A co-cultura, que implica o crescimento simultâneo de diversas espécies, unindo microrganismos variados em um mesmo ambiente, foi analisada com maior detalhamento mediante a preparação de lâminas temporárias e a subsequente análise no Microscópio Nikon Eclipse E200. Essas lâminas possibilitaram a identificação da coexistência de duas espécies distintas na co-cultura na relação microalga e cianobactéria (*Chlorella* e *Oscillatoria*) a nível de gênero, além da observação da formação de aglomerados resultantes da compactação de células da microalga com os filamentos das cianobactérias envolvidos por uma bainha mucilaginosa, conforme evidenciado na Figura 42.

Figura 42 - Co-cultura de microalgas e cianobactérias com aumento de 400 x.



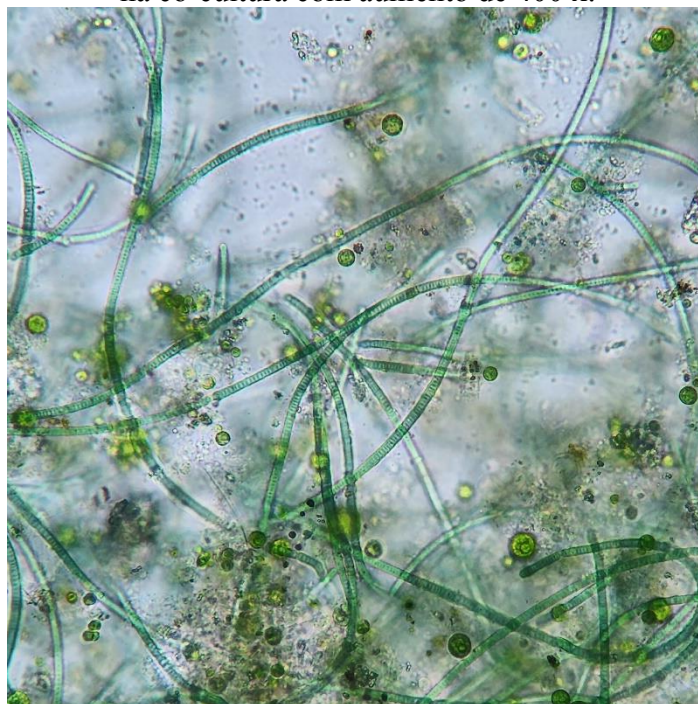
Fonte: próprio autor (2024).

Gradualmente, a co-cultura vem conquistando espaço no âmbito da microbiologia, tornando-se uma escolha vantajosa quando há uma interação harmoniosa entre as espécies ativas no consórcio microbiológico. O consórcio microalga-cianobactéria pode dar origem a interações ecológicas mutualísticas ou competitivas. De acordo com Zhu *et al.* (2019), interações competitivas possibilitam que uma espécie beneficie-se à custa de outra, resultando em redução na aptidão, exploração ou parasitismo. Por outro lado, a interação cooperativa aproveita a atividade mútua, com interações recíprocas entre microalgas que podem promover a absorção sistêmica de nutrientes e o crescimento harmônico de ambas.

As cianobactérias, microrganismos unicelulares que podem viver isoladamente ou em colônias, desempenham um papel significativo no contexto ecológico, envolvendo diferentes interações harmônicas ou desarmônicas no ambiente natural, dependendo do habitat e de suas necessidades fisiológicas (Perreira, 2020).

As cianobactérias apresentam uma variedade de formatos, como filamentos, bastões ou esferas. A Figura 43 ilustra cianobactérias na forma filamentosa, envoltas por bainha mucilaginosa, podendo estar agrupadas com outras cianobactérias, microalgas ou até mesmo apresentar uma disposição mais livre no meio aquoso.

Figura 43 - Prolongamentos dos filamentos das cianobactérias em comparação as microalgas na co-cultura com aumento de 400 x.



Fonte: próprio autor (2024).

Zhu *et al.* (2019) e Dutra (2021) destacam, em seus estudos sobre co-cultura, que as cianobactérias podem desempenhar um papel crucial ao promover reações bioquímicas benéficas para outros organismos, como as microalgas. A eficácia dessa associação é fortemente influenciada pelas espécies envolvidas no estudo e pelos objetivos específicos da pesquisa.

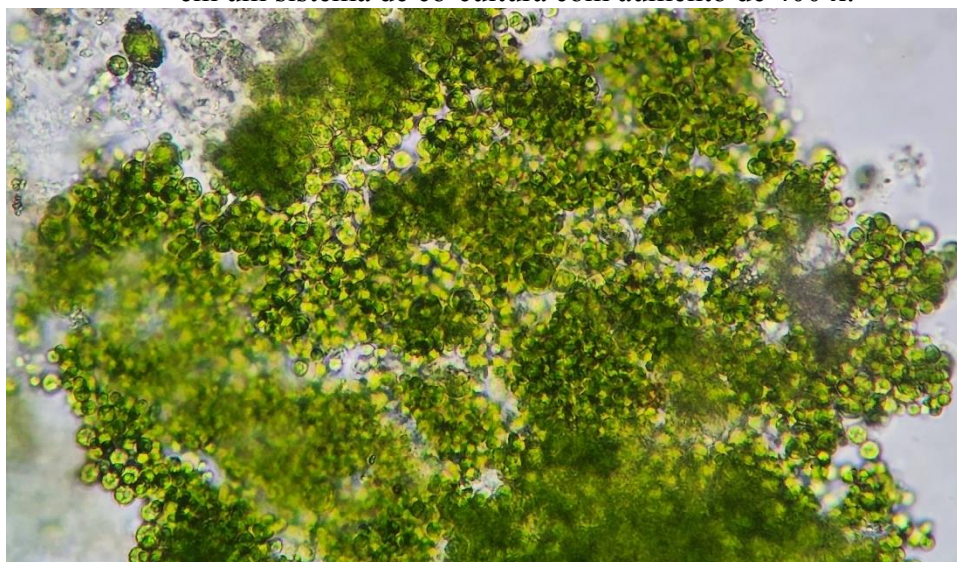
As microalgas empregadas nesse estudo de co-cultura pertencem ao Filo Chlorophyta, integrando o grupo de algas unicelulares, microscópicas e eucariotas. As características observadas nesses microrganismos coincidem com as descrições de Chiesa (2019), Borges (2014), Vidal (2015), Vieira (2013) e Assis Neto (2022). Esses autores utilizam uma espécie do gênero *Chlorella* para diversas finalidades, como a obtenção de óleo e biomassa, a síntese de biodiesel e a produção de outros co-produtos.

As espécies pertencentes ao gênero *Chlorella* (Figura 44) se destacam por armazenar óleo em suas células, conferindo a essas espécies do gênero um potencial significativo para a produção de biocombustíveis (Vieira, 2013).

Quanto à morfologia dessas espécies, apresentam diversos elementos vegetais que as diferenciam do reino Plantae. O citoplasma é constituído por água, proteínas solúveis e minerais, abrigo das organelas das microalgas. Suas mitocôndrias possuem uma membrana

dupla contendo proteínas e fosfolipídios. Além disso, possuem um único cloroplasto com uma membrana externa permeável a metabólitos e íons, enquanto a membrana interna desempenha um papel crucial no transporte de proteínas (Assis Neto, 2022).

Figura 44 - Microscopia de luz de uma espécie de microalgas do gênero *Chlorella* em colônia em um sistema de co-cultura com aumento de 400 x.



Fonte: próprio autor (2024).

A interação entre cianobactéria e microalga demonstra relações harmônicas no que diz respeito ao crescimento e à vida celular. Estudos de Magdouli, Brar e Blais (2016) revelam que espécies distintas podem manifestar resistências a outros organismos, ao mesmo tempo em que os estimulam em diversos aspectos, relacionados à bioquímica celular e estruturas de membranas. Esses mecanismos sinérgicos podem variar de acordo com a natureza específica da relação entre as espécies envolvidas.

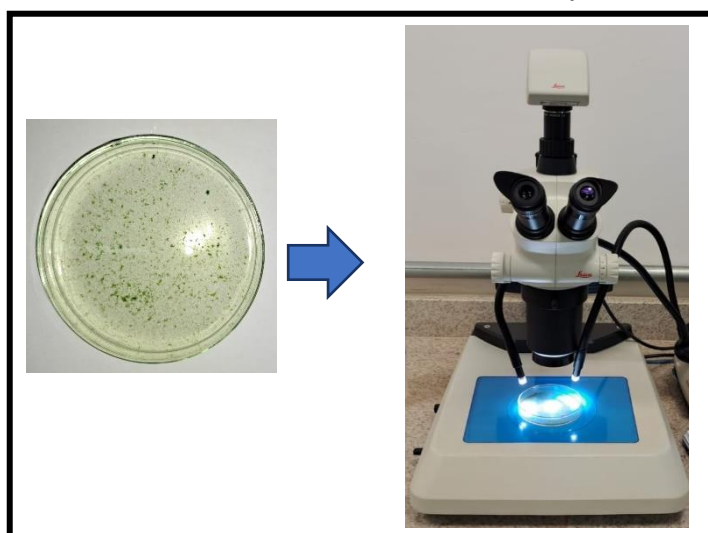
Além disso, a relação simbiótica entre cianobactérias e microalgas desempenha um papel crucial na otimização de processos metabólicos, como a fixação de carbono e a produção de compostos bioquímicos. Estudos indicam que, nessa coexistência, as cianobactérias podem fornecer substratos essenciais, como nitrogênio e fósforo, às microalgas, enquanto estas, por sua vez, contribuem com compostos orgânicos resultantes da fotossíntese. Essa troca de nutrientes e metabólitos pode promover um ambiente propício ao crescimento equilibrado de ambas as espécies, maximizando assim a produção de biomassa e a síntese de substâncias de interesse, como lipídeos e pigmentos. Essa dinâmica interativa entre cianobactérias e microalgas destaca a importância das relações harmônicas para

aplicações potenciais em diversas áreas, como a produção de biocombustíveis e compostos de valor agregado.

5.4.3 – Estereomicroscópio

O microscópio de luz empregado nesta pesquisa é equipado com mecanismos específicos para a visualização de meios aquosos, proporcionando também a capacidade de observação tridimensional de microrganismos e materiais. As análises foram conduzidas por meio do estereomicroscópio modelo S8 APO, com a ativação de feixes de luz para a observação de meios aquosos, utilizando uma iluminação invertida em placas de Petri que continham a co-cultura, conforme apresentada na Figura 45.

Figura 45 - Estereomicroscópio preparado para observação da co-cultura de microalgas e cianobactérias utilizando a iluminação invertida.



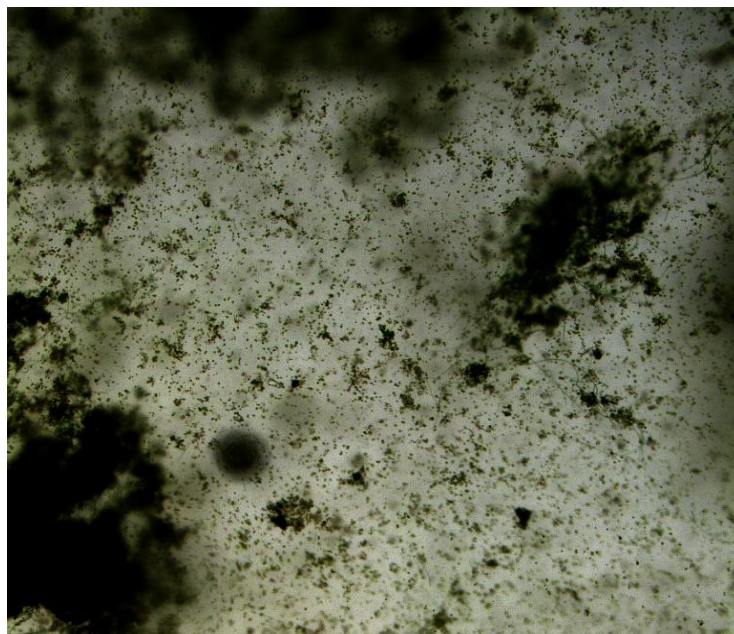
Fonte: próprio autor (2024).

O estereomicroscópio oferece versatilidade ao possibilitar a visualização tanto de meios aquosos quanto sólidos, conforme necessário pela metodologia empregada. Neste trabalho, seu uso destinou-se à observação do co-cultivo em meio aquoso, com e sem iluminação invertida, assim como para a visualização da biomassa em diferentes estados (úmida, seca e óleo) das microalgas e cianobactérias.

A utilização da iluminação invertida proporciona a observação detalhada de microalgas e cianobactérias em meio líquido, como evidenciado na Figura 46. Conforme destacado por Halmenschlager *et al.* (2019), um microscópio de modelo invertido possui sua

fonte de luz e condensador localizados no topo, voltados para baixo, enquanto suas objetivas e torre podem estar dispostas abaixo, voltadas para cima.

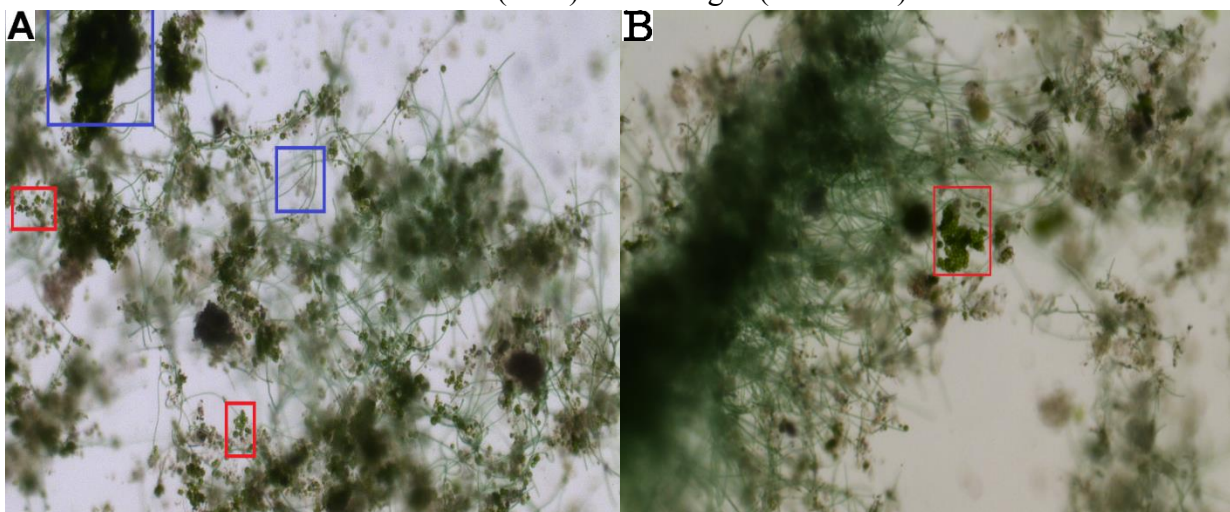
Figura 46 - Estereomicroscopia com luz invertida para visualização do cultivo de microalgas e cianobactérias.



Fonte: próprio autor (2024).

O estereomicroscópio possibilita a observação de colônias densamente agrupadas de microalgas e cianobactérias, como ilustrado nos diferentes segmentos apresentados nas Figuras 47 A e B. As microalgas são visíveis em formato circular no meio aquoso, enquanto as cianobactérias formam colônias mais densas, encontradas tanto na parte superior quanto na inferior da Figura.

Figura 47 - Estereomicroscopia com luz invertida para visualização de estruturas celulares de cianobactérias (Azul) e microalgas (Vermelho).



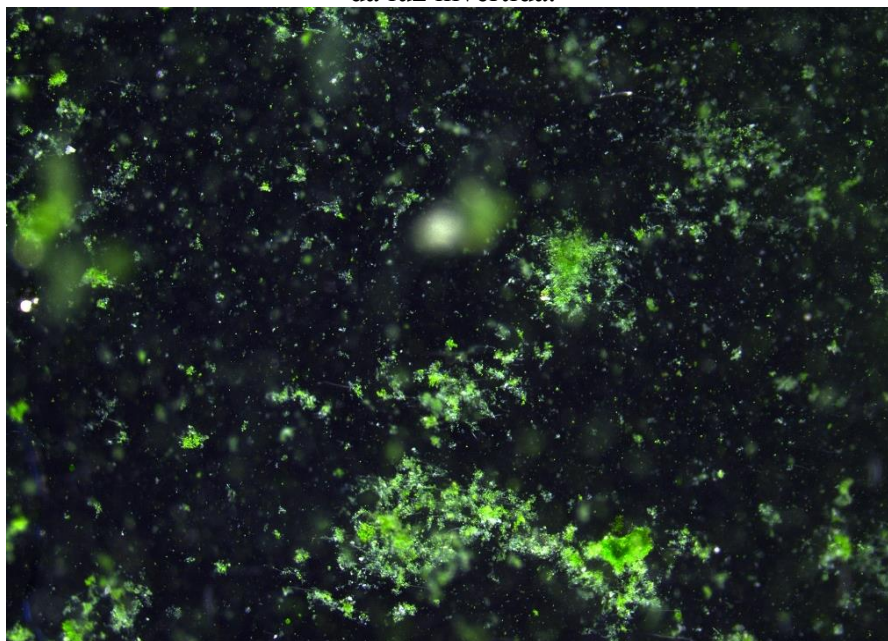
Fonte: próprio autor (2024).

As análises realizadas por meio do microscópio de luz e da estereomicroscopia confirmam, em concordância com a literatura, a presença da co-cultura nos cultivos examinados neste estudo, mantendo as características previamente mencionadas. As colônias de *Chlorella* sp., destacadas em vermelho, são visíveis em diferentes regiões da Figura 47, enquanto os filamentos das cianobactérias, apresentados em azul, podem ser observados de forma mais independente, bem como em associação com uma espécie do gênero *Chlorella* na parte superior esquerda, da Figura 47-A.

Os filamentos das cianobactérias, caracterizados pela presença da bainha mucilaginosa, desempenham um papel crucial no revestimento celular, encontrando-se na parte externa da parede celular das cianobactérias. Essa estrutura atua de maneira ativa na absorção de nutrientes e em trocas seletivas com o meio externo, conforme destacado por Rós (2012).

A estereomicroscopia possibilita a visualização de colônias de microalgas e cianobactérias tanto com luz invertida quanto na ausência dessa técnica. Na Figura 48, é apresentada a estereomicroscopia sem luz invertida, permitindo a observação dos microrganismos com a coloração real.

Figura 48 - Estereomicroscopia do co-cultivo de microalgas e cianobactérias com a ausência da luz invertida.

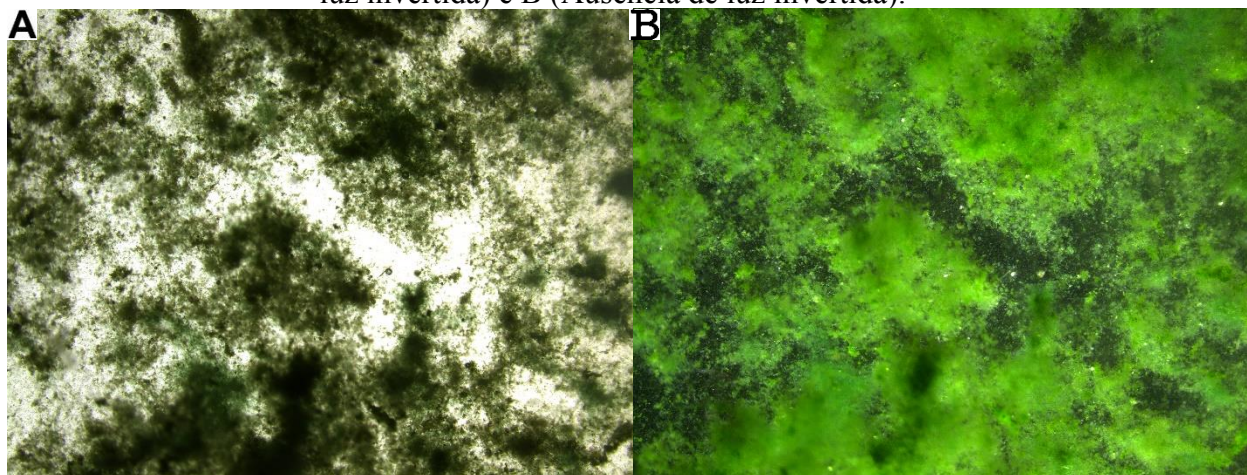


Fonte: próprio autor (2024).

A visualização e a captura de imagens em estereomicroscópios desempenham um papel crucial, uma vez que os microscópios biológicos invertidos são particularmente úteis para observar células vivas ou organismos no fundo de recipientes maiores, como placas de Petri, em condições mais próximas da natureza do que seria possível com lâminas, como em microscópios convencionais (PÉREZ, 2018) e (RUBIO, 2018).

A Figura 49 apresenta duas imagens da mesma placa de Petri com distinção de luz invertida. Na Figura 49–A, a cultura biológica é exibida com luz invertida, resultando em um aspecto de coloração mais fosca dos microrganismos. Já a Figura 49–B revela a ausência de luz invertida, permitindo visualizar a co-cultura com sua coloração natural, destacando as microalgas e o adensamento dos microrganismos de maneira mais proeminente.

Figura 49 - Estereomicroscopia em co-cultivo de microalgas e cianobactérias. A (Presença de luz invertida) e B (Ausência de luz invertida).



Fonte: próprio autor (2024).

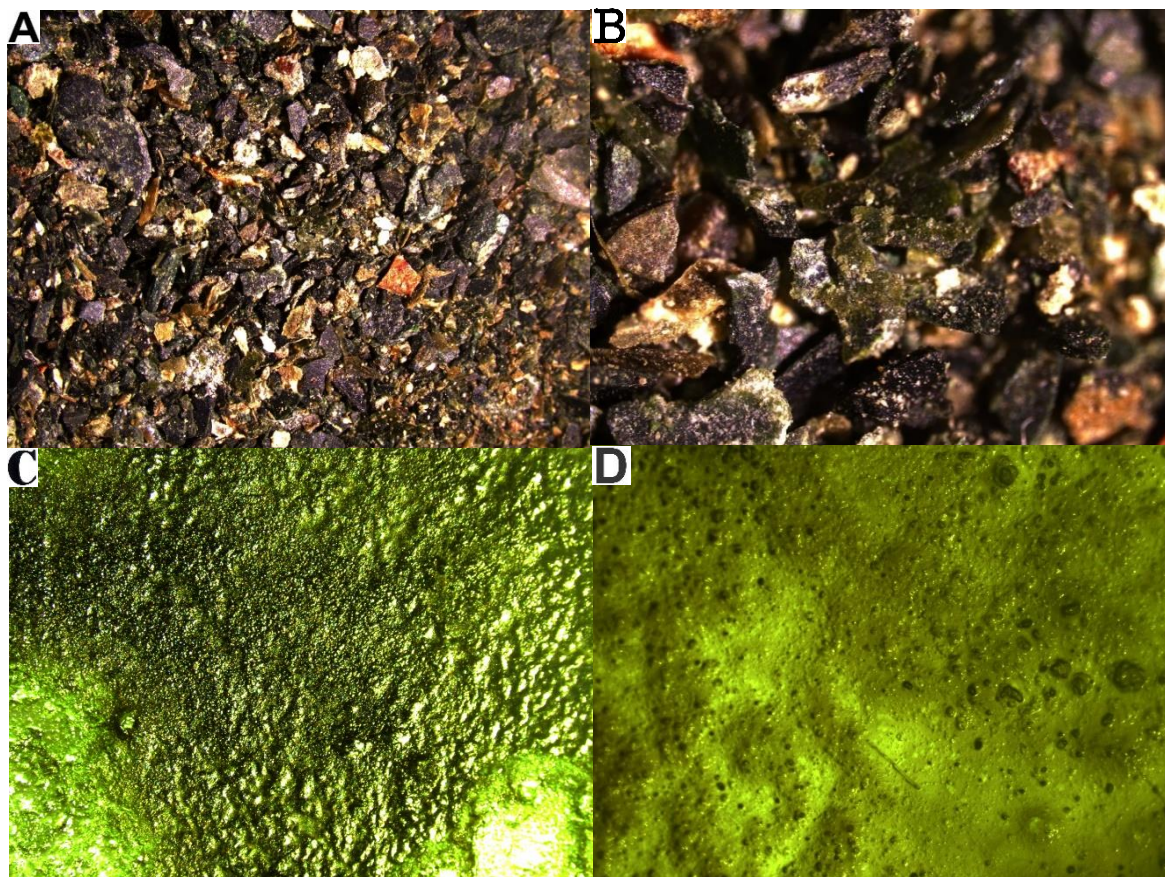
Conforme os objetivos estabelecidos, diferentes metodologias podem ser empregadas para visualizar materiais biológicos e seus produtos de alto valor agregado, de acordo com o procedimento experimental adotado (PÉREZ, 2018).

Neste estudo, os procedimentos experimentais permitiram a observação da co-cultura em diversos aspectos no estereomicroscópio, abrangendo:

- Co-cultura viva em meio aquoso;
- Biomassa úmida, após o processo de cultivo;
- Biomassa seca, resultante da secagem em estufa;
- Biomassa seca macerada;
- Biomassa úmida/seca, pós-processo de extração lipídica;
- Óleo, proveniente do processo de extração lipídica;
- Biodiesel in situ;
- Biomassa residual, após o processo de produção de biodiesel in situ.

A Figura 50 ilustra exemplos de estereomicroscopia aplicada a materiais biológicos, como biomassa seca (após o processo de secagem e maceração) e óleo de microalgas e cianobactérias, obtidos por meio do processo de extração.

Figura 50 - Estereomicroscopia de materiais biológicos após o co-cultivo de microalgas e cianobactérias. A e B apresenta a biomassa (com diferentes ampliações) após o processo de secagem e maceração. C e D apresenta o óleo das microalgas e cianobactérias (com diferentes ampliações) após o processo de extração lipídica.



Fonte: próprio autor (2024).

5.5. Comportamento da co-cultura em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo

A Tabela 10 apresenta os resultados dos 15 ensaios provenientes do planejamento experimental do tipo Döehlert. Os dados fornecidos referem-se à biomassa seca, obtida após a centrifugação do meio, remoção da água, secagem e pesagem da biomassa. A quantidade de óleo gerada a partir da extração lipídica foi medida pesando as placas de Petri em uma balança analítica, e o teor de lipídeos foi calculado relacionando a biomassa seca e o teor de óleo, conforme expresso pela Equação 1 apresentada na metodologia.

No que diz respeito à quantidade de biomassa seca, os ensaios mais bem-sucedidos foram o ensaio 1 (1,234 g), ensaio 3 (1,077 g), ensaio 4 (0,876 g), ensaio 2 (0,876 g) e ensaio 8 (0,826 g). Esses resultados são altamente promissores para pesquisas que visam utilizar a biomassa na produção *in situ* de biodiesel ou na geração de outros subprodutos, como biochar.

Com base nessas análises, é possível identificar as condições experimentais que resultaram nos melhores rendimentos em óleo, sendo essencial para a otimização de processos em escala industrial.

Diante desses resultados positivos futuras pesquisas podem se concentrar no aprimoramento das técnicas de produção, buscando maior eficiência na extração de óleo e desenvolvendo métodos mais eficazes para a valorização dos co-produtos derivados da biomassa.

Os ensaios destacados na Tabela 10 apresentam-se como promissoras, tanto em termos de quantidade de biomassa seca quanto na produção de óleo ou para a produção de biodiesel a partir do óleo das microalgas e cianobactérias e biodiesel *in situ* e biochar a partir da biomassa.

Os ensaios mencionados anteriormente apresentaram valores significativos em termos da quantidade de óleo em gramas, com exceção do ensaio 4, que registrou um valor de 0,087 g, considerado baixo de acordo com Costa (2018) ao considerar a relação biomassa-lipídeos. Ao analisar essa relação, observa-se que os ensaios 1, 2, 3, 4 e 8 não obtiveram os melhores resultados em relação ao teor de lipídeos, apresentando valores de 19,85%, 19,88%, 19,96%, 9,45% e 12,22%, respectivamente.

Tabela 10 – Resultados para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa para co-cultivo de microalgas e cianobactérias

Ensaio	Biomassa seca (g/L)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)	Teor de lipídeos extraído das células (%)
1	1,234	0,245	19,85
2	0,876	0,173	19,88
3	1,077	0,215	19,96
4	0,920	0,087	9,45
5	0,582	0,064	10,99
6	0,310	0,093	30,00
7	0,725	0,258	35,58
8	0,826	0,101	12,22
9	0,688	0,183	26,59
10	0,712	0,208	29,21
11	0,744	0,128	17,20
12	0,559	0,233	41,68
13	0,753	0,081	10,75
14	0,689	0,072	10,44
15	0,753	0,078	10,35

Fonte: próprio autor (2024).

É perceptível que esses cinco ensaios não se destacam entre os melhores em termos de percentagem de teor de lipídeos. Confirma-se, assim, a validade da relação inversa entre biomassa e lipídeos, onde uma maior quantidade de biomassa não representa necessariamente uma condição lipídica superior, conforme demonstrado em estudos anteriores de Hakalin (2014), Borges (2014), Oliveira (2019), Chiesa (2019), Dias (2019), Rós (2022), Souza (2018), Cordeiro (2015), que também investigaram a relação biomassa-lipídeos para a produção de bio-óleo ou outros biocombustíveis a partir de diferentes espécies de microalgas e cianobactérias.

Ao considerar a relação de baixa biomassa e alto teor de lipídeos, destacam-se os ensaios 12 (41,68%), 7 (35,58%), 6 (30,00%), 10 (29,21%) e 9 (26,59%). Esses ensaios apresentaram as maiores condições lipídicas como resposta ao planejamento experimental. Nota-se que os valores de biomassa seca estão entre os mais baixos entre os ensaios, reforçando a ideia de que a relação biomassa-lipídeos é inversamente proporcional, conforme evidenciado na Tabela 10.

A Tabela 11 apresenta os resultados dos 15 ensaios a partir do planejamento experimental do Döehlert, comparando-os com a literatura que aborda espécies de microalgas e cianobactérias cultivadas em monoculturas. A busca na literatura para comparação de teores lipídicos a partir de co-culturas de microalgas e cianobactérias foi desafiadora, uma vez que os bancos de cultivos desses organismos atualmente priorizam o cultivo em monoculturas. Co-culturas ainda são vistas como desfavoráveis devido a diversos fatores negativos que podem influenciar as respostas indesejáveis dependendo do estudo realizado.

A preferência pelas monoculturas se deve ao controle mais fácil das condições de cultivo, à maior previsibilidade dos resultados e à minimização de possíveis efeitos negativos resultantes das interações entre diferentes espécies.

No entanto, é importante destacar que, mesmo com a prevalência de estudos em monoculturas, as co-culturas podem oferecer vantagens significativas em termos de produtividade e sustentabilidade. A associação de diferentes espécies em co-cultura pode permitir a utilização mais eficiente de nutrientes, a redução da competição por recursos, a promoção do crescimento e, potencialmente, a produção de compostos de interesse comercial.

A partir do planejamento experimental, os ensaios 12, 7, 6, 10 e 9 foram identificados como aqueles que apresentaram as maiores condições lipídicas, apesar de terem baixa biomassa seca. Isso sugere que, embora a biomassa seja reduzida nesses ensaios, a proporção de lipídios em relação à biomassa é alta, tornando-os interessantes para aplicações que valorizam a produção de lipídeos. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para entender melhor como as co-culturas podem ser otimizadas para obter altos teores de lipídios, além de considerar outros parâmetros relevantes, como produtividade, viabilidade econômica e potenciais efeitos adversos.

Tabela 11 – Comparação do teor lipídico da co-cultura entre microalgas e cianobactérias com a literatura.

Ensaio	Teor lipídico (%) (Autor)	Espécie de cianobactéria	Referência	Espécie de microalga	Referência
1	19,85	<i>Nostoc calciola</i>	Souza (2018)	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Chisti (2012)
2	19,88	<i>Amazoninema brasiliense</i>	Souza (2018)	<i>C. sorokiniana</i>	Chisti (2012)
3	19,96	<i>Oscillatoria amoena</i>	Cordeiro (2015)	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Cordeiro (2015)
4	9,45	<i>Synechococcus</i> sp.	Rós (2012)	<i>Chlorella</i> sp.	Chiesa (2019)
5	10,99	<i>Lyngbya dendrobia</i>	Rós (2012)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Borges (2014)
6	30,00	<i>Amazoninema brasiliense</i>	Souza (2018)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Hakalin (2014)
7	35,58	<i>Planktothrix mougeotii</i>	Souza (2018)	<i>Chorella emersonii</i>	Cordeiro (2015)
8	12,22	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Miao, Wu (2004)	<i>Chlorella fusca</i>	Silva (2022)
9	26,59	<i>Phormidium purpurescens</i>	Miao, Wu (2004)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Hakalin (2014)
10	29,21	<i>Planktothrix mougeotii</i>	Souza (2018)	<i>Ankistrodesmis</i> sp.	Cordeiro (2015)
11	17,20	<i>Oscillatoria chloria</i>	Sharathchandra et al. (2011)	<i>Spirulina</i> sp.	Andrade (2022)
12	41,68	<i>Cyanobacterium aponinum</i>	Karatay, Donmez (2011)	<i>Chlorella</i> sp.	Chiesa (2019)
13	10,75	<i>Phormidium ambiguum</i>	Sharathchandra et al. (2011)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Borges (2014)
14	10,44	<i>Aphanothece</i> sp.	Calixto et al. (2018)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Oliveira (2019)
15	10,35	<i>Aphanothece</i> sp.	Calixto et al. (2018)	<i>Scenedesmus</i> sp.	Oliveira (2019)

Fonte: próprio autor (2024).

As monoculturas oferecem diversas vantagens para os pesquisadores, uma vez que geralmente seguem padrões predefinidos, juntamente com protocolos microbiológicos claros. Ao focar em uma única espécie de microalga, por exemplo, as pesquisas podem otimizar os níveis de produtividade, permitindo que os laboratórios se especializem na síntese de biomoléculas específicas, além de ajustar os equipamentos utilizados durante os processos adotados (Medrado, 2020).

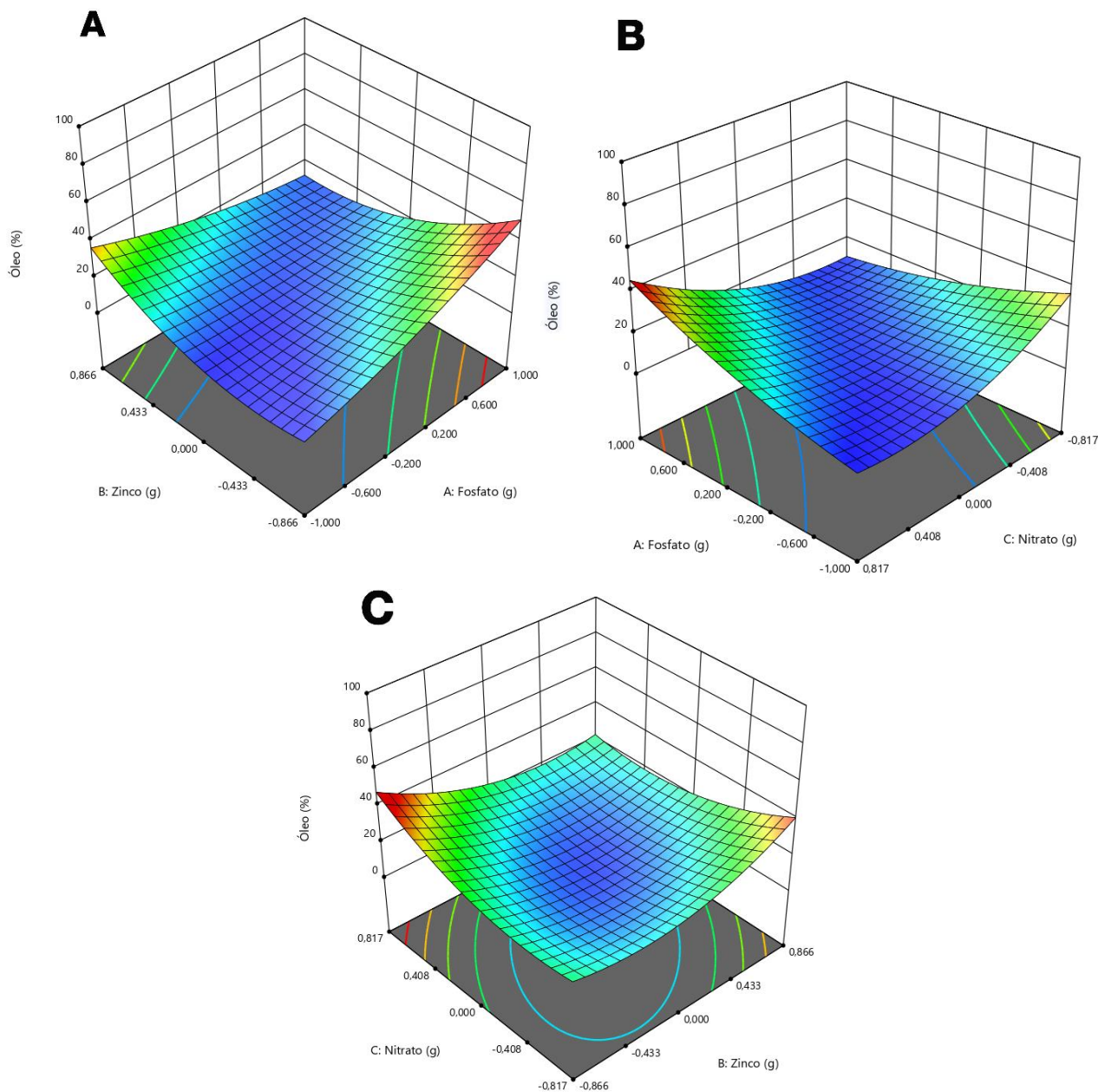
Atualmente, os co-cultivos de microrganismos apresentam uma série de desafios, como a necessidade de conhecimento das espécies envolvidas, estudo das interações entre elas, utilização de mecanismos alternativos para obter resultados desejados, diferentes tipos de reagentes, vidrarias e avaliação complexa. No entanto, a adoção de co-culturas pode proporcionar vantagens que as monoculturas não conseguem manifestar, tais como diversidade biológica, potencial para interações harmônicas que resultam em diferentes produtos ou aumento de sua produção, competitividade entre as espécies para otimizar o rendimento, inovação e resultados positivos inesperados (Medrado, 2020; Zhu *et al.*, 2019).

As modificações nutricionais nos meios de cultivo, conforme planejado pela matriz Doehlert, conduziram a resultados distintos em termos de rendimento de biomassa, quantidade de óleo e porcentagem lipídica. Essas variações podem ser visualizadas nas Tabelas 10 e 11, em comparação com a Figura 51, que exibe três gráficos de superfície de resposta, destacando as relações nutricionais entre zinco, fosfato e nitrato.

Após o processamento das informações por meio do software específico, foram gerados três gráficos de superfície de resposta, revelando valores desejáveis para zinco, fosfato e nitrato visando futuros cultivos para rendimento lipídico.

A Figura 51–A destaca a relação entre zinco e fosfato, onde os valores decodificados nos eixos laterais indicam que, para otimizar rendimentos lipídicos, é recomendado o uso de quantidades menores de zinco e valores mais elevados de fosfato. Na Figura 51–B, a relação entre fosfato e nitrato é apresentada, evidenciando a superioridade das condições de fosfato em relação ao outro nutriente. No entanto, a quantidade de nitrato indicada sugere que as condições nutricionais para este reagente devem ser superiores às já utilizadas no meio de cultivo ASM1.

Figura 51 - Superfície de resposta para as relações nutricionais entre zinco, fosfato e nitrato.
 A – Gráfico zinco vs. Fosfato. B – Nitrato vs. Fosfato. C – Nitrato vs. Zinco.



Fonte: próprio autor (2024).

A Figura 51–C destaca a relação entre nitrato e zinco. Os valores apresentados indicam uma relação positiva entre nitrato e zinco, com ênfase no primeiro reagente. Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos até o momento, definiu-se que as melhores condições nutricionais, conforme o planejamento experimental, são fosfato com 22,400g, nitrato com 0,255g e zinco com 0,030g, para rendimento lipídico.

A variação nutricional proveniente do planejamento experimental é crucial, pois o fosfato desempenha funções essenciais em microrganismos, incluindo a estruturação de

organelas, transferência de energia, respiração celular e fotossíntese. O nitrato contribui para a formação de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintéticos. Por fim, a variação de zinco pode impactar as relações estruturais e bioquímicas das microalgas e cianobactérias (Cordeiro, 2015).

A interação complexa entre esses nutrientes, quando alterada, pode resultar em desempenhos superiores em comparação com as condições de monoculturas de diferentes espécies de microalgas e cianobactérias. Além disso, esse ajuste pode potencializar mecanismos bioquímicos relacionados à rota lipídica, fotossíntese e irritabilidade biológica.

5.6. Comportamento da co-cultura em relação ao teor e rendimento de biomassa

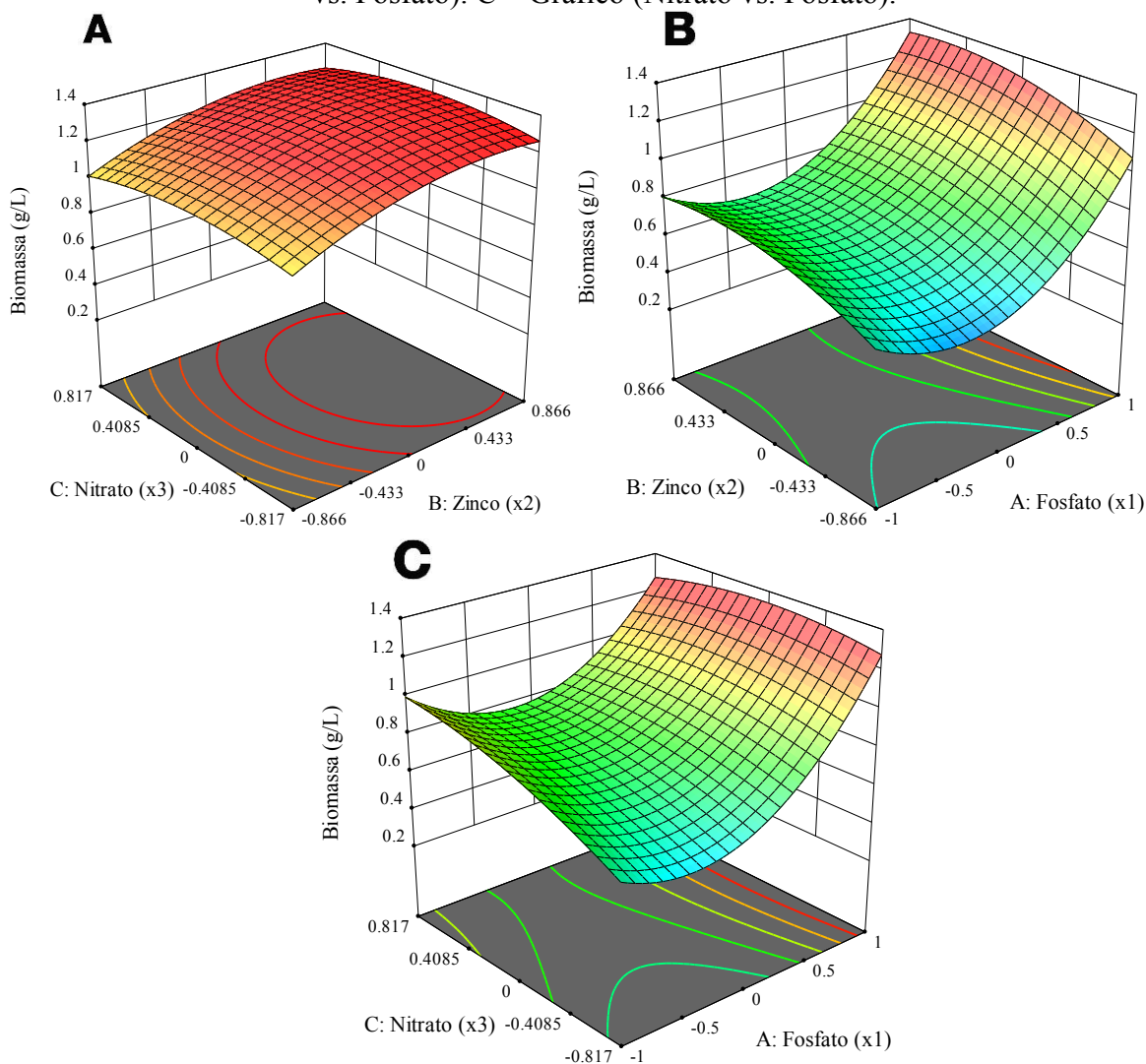
Com base na matriz de planejamento Doehlert, foram obtidos resultados distintos em relação ao rendimento de biomassa, conforme apresentados na Tabela 11. A biomassa de microalgas e cianobactérias desempenha um papel crucial na área de biocombustíveis devido ao seu potencial energético.

A biomassa microalgal pode ser aproveitada de diversas maneiras na área de biocombustíveis, tais como:

- Extração lipídica da biomassa pura para a produção subsequente de biodiesel;
- Utilização direta da biomassa no processo de produção de biodiesel *in situ*;
- Queima da biomassa seca para geração de calor e energia;
- Produção de biochar;
- Aproveitamento da biomassa residual dos processos de produção de biodiesel (a partir do óleo) e biodiesel *in situ* para a produção de outros biocombustíveis.

A partir desses dados, foram gerados três gráficos de superfície de resposta, que destacam as relações nutricionais entre zinco, fosfato e nitrato na produção e rendimento de biomassa em um sistema de co-cultura.

Figura 52 - Superfície de resposta para as relações nutricionais entre zinco, fosfato e nitrato, relacionado ao rendimento de biomassa. A – Gráfico (Nitrato vs. Zinco). B – Gráfico (Zinco vs. Fosfato). C – Gráfico (Nitrato vs. Fosfato).



Fonte: próprio autor (2024).

Os resultados dos três gráficos, analisados de forma conjunta, indicam que o fosfato é o nutriente mais importante para a produção de biomassa seca. Isso pode ser observado pela lateral dos gráficos onde o eixo corresponde ao fosfato, há sempre uma inclinação acentuada para o fosfato e o mesmo não ocorre para o nitrato e para o zinco, em que as inclinações em seus eixos são quase constantes. Ou seja, dentro das condições avaliadas, a quantidade de zinco e de nitrato possuem pouco efeito na produção de biomassa seca. Quando se observa o primeiro gráfico de superfície de respostas, observa-se que na máxima quantidade de fosfato $x_1 = 1,000$ (22,4 gramas), usado como nutriente no estudo, obtém-se uma superfície com o máximo centrado na condição de x_2 (massa de zinco) = 0,433 (0,48 gramas) e x_3 (massa de nitrato) = 0,000 (0,170 gramas). Ou seja, sua condição ótima para a produção de biomassa

seca seria dada pelas quantidades de massa de zinco 0,48 g, massa de nitrato 0,17 g e massa de fosfato 22,40 g.

Nesta condição, você obtém 1,3 g/L de biomassa seca. O modelo estatístico ajustado para essa determinação é o modelo quadrático reduzido, cuja equação obtida é:

$$y = 0,6582 + 0,2230x_1 + 0,1116x_2 + 0,0926x_3 + 0,3936x_1^2$$

Os parâmetros de ajuste deste modelo podem ser observados na Tabela da ANOVA (Análise de Variância):

Tabela 12 – Tabela da análise de variância para rendimento de biomassa.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-valor	p-valor	
Modelo	0,5390	4	0,1347	11,41	0,0010	Significativo
x ₁ (fosfato)	0,1989	1	0,1989	16,84	0,0021	
x ₂ (zinco)	0,0665	1	0,0665	5,63	0,0392	
x ₃ (nitrato)	0,0515	1	0,0515	4,36	0,0634*	
x ₁ ²	0,2221	1	0,2221	18,80	0,0015	
Resíduos	0,1181	10	0,0118			
Falta de ajuste	0,1154	8	0,0144	10,57	0,0893	Não significativo
Erro puro	0,0027	2	0,0014			
Variação total	0,6571	14				

Fonte: próprio autor (2024).

De acordo com a Tabela da ANOVA, o modelo de regressão ajustado para explicar a variação da resposta no experimento para otimizar as condições de obtenção de biomassa seca é significativo, enquanto a falta de ajuste para o modelo não foi significativa. Isto significa que o modelo matemático está ajustado aos dados experimentais e permite prever o teor de biomassa seca produzida a partir da seleção de massas de zinco, nitrato e fosfato, dentro dos limites das condições estudadas. Pela tabela é possível verificar ainda que o teor de nitrato não é significativo na produção de biomassa seca, uma vez que o p-valor para x₃ foi maior que 0,05.

Outro parâmetro que permite confirmar a validade do modelo de previsão de biomassa seca é o coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}). Os valores de R^2 e R^2_{ajustado} foram, respectivamente, 0,82 e 0,75. Isto quer dizer que de todas as variações ocorridas no experimento, 82 % são explicáveis e, destas, 75 % foram explicadas pelo modelo ajustado.

O uso do planejamento experimental e a otimização das condições nutricionais através dos gráficos de superfície de resposta são abordagens muito importantes na obtenção de melhores resultados em cultivos de microalgas e cianobactérias. A variação dos nutrientes, como fosfato, nitrato e zinco, desempenha um papel crucial no desempenho e no metabolismo desses organismos, tanto para rendimento de biomassa, como para rendimento de lipídeos.

A Tabela 13 representa os valores de biomassa seca conforme o planejamento experimental Döehlert. Esses dados referem-se à biomassa seca obtida após a centrifugação do meio, remoção da água, secagem e pesagem da biomassa. Ao agrupar a matriz de planejamento com os resultados de biomassa seca, observamos que o único experimento que apresenta um valor de fosfato de 22,40 g é o reator um, com valor de 1,234 g/L de biomassa seca. Isso indica que os valores estão de acordo com os resultados da análise de variância, que prevê um rendimento de 1,3 g/L quando os cultivos são otimizados.

Os melhores rendimentos de biomassa após o cultivo foram observados nos experimentos três (1,077 g/L), quatro (0,920 g/L) e oito (0,826 g/L). É importante lembrar que, devido ao uso do planejamento experimental, os valores de fosfato, nitrato e zinco variaram.

Tabela 13 – Resultados para quantidade de biomassa seca para cultivo de biochar.

Ensaio	Biomassa seca (g/L)
1	1,234
2	0,876
3	1,077
4	0,920
5	0,582
6	0,310
7	0,725
8	0,826
9	0,688
10	0,712
11	0,744
12	0,559
13	0,753
14	0,689
15	0,753

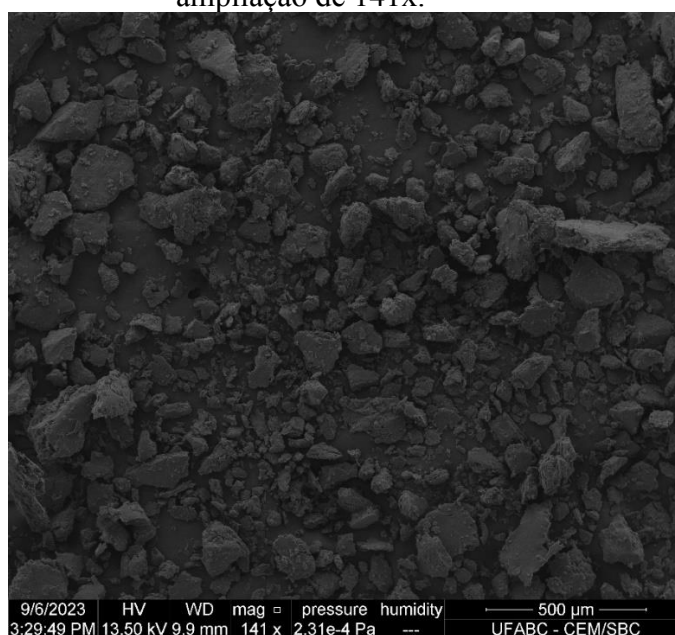
Fonte: próprio autor (2024).

As análises estatísticas indicam que o fosfato é o nutriente mais importante para a produção de biomassa nas co-culturas. Os valores de fosfato nos três reatores com maior destaque (exceto o primeiro) são diferentes: reator três com 19,9 g, reator quatro com 12,4 g e reator cinco com 14,9 g. É importante destacar que a depleção deste nutriente nos co-cultivos contribui para a redução da quantidade de biomassa seca.

5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

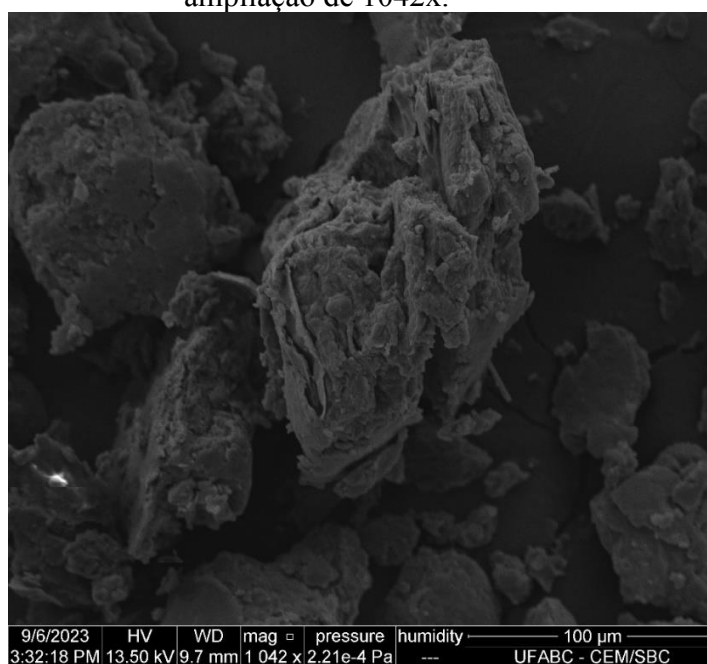
As análises de MEV foram realizadas com o objetivo de observar a morfologia dos materiais. As micrografias da biomassa seca, se deu com as ampliações de 141, 1042, 1611, 1909, 2563 e 2689 vezes, estão apresentadas nas Figuras 53, 54, 55, 56, 57 e 58, respectivamente.

Figura 53 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 141x.



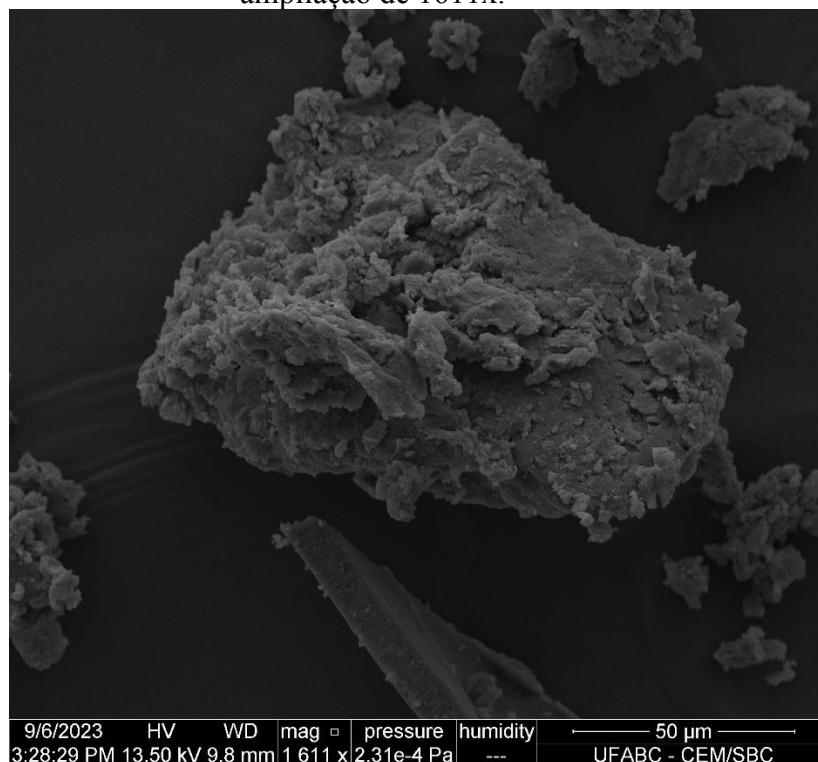
Fonte: próprio autor (2024).

Figura 54 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 1042x.



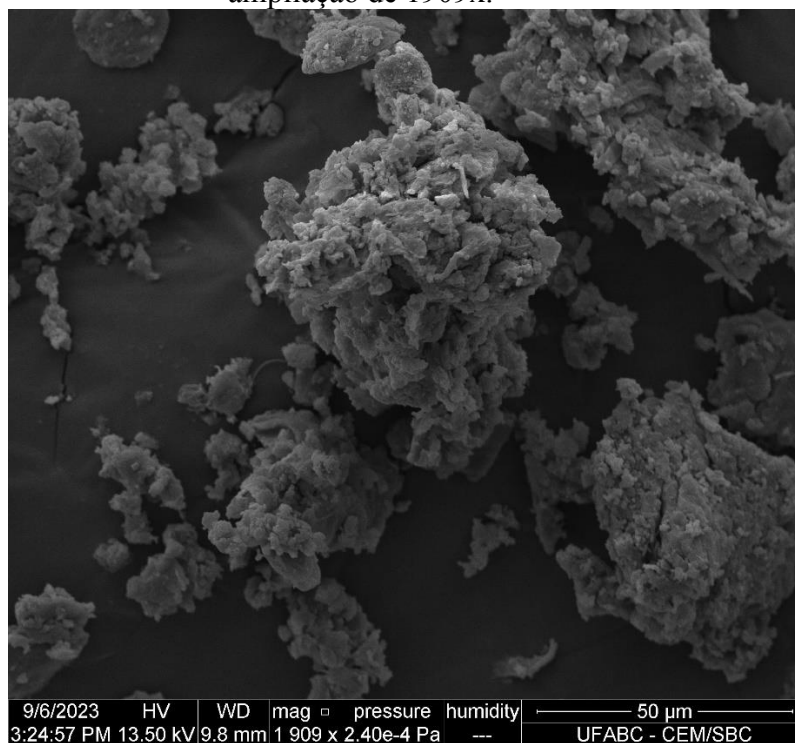
Fonte: próprio autor (2024).

Figura 55 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 1611x.



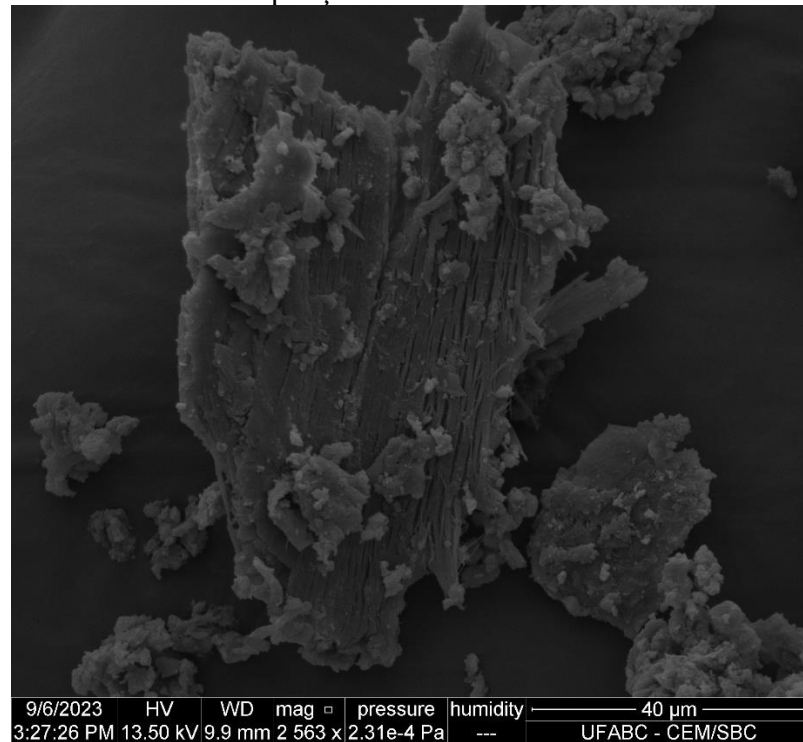
Fonte: próprio autor (2024).

Figura 56 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 1909x.



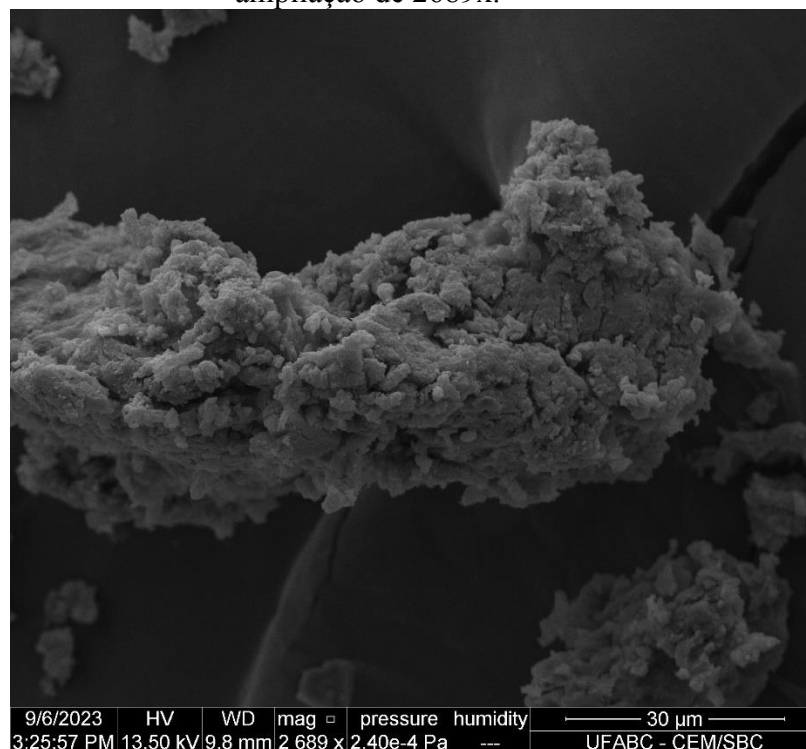
Fonte: próprio autor (2024).

Figura 57 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 2563x.



Fonte: próprio autor (2024).

Figura 58 - Microscopia eletrônica de varredura da biomassa seca da co-cultura com ampliação de 2689x.



Fonte: próprio autor (2024).

A micrografia obtida pela Figura 53, com ampliação de 141 vezes, se assemelham muito com as imagens obtidas pela estereomicroscopia de materiais biológicos da biomassa após o processo de secagem e maceração, apresentada na Figura 50 (A e B). Pode-se perceber que as imagens de microscopia e estereomicroscopia se assemelham muito, pois as ampliações são bem semelhantes.

As imagens 54, 55, 56 e 58 apresentam semelhanças com as ilustrações de Kalinke (2019), nas quais a pesquisadora explorou a utilização de biomassa vegetal para a produção de biochar. As amostras apresentadas revelam a porosidade da biomassa, especialmente nas Figuras 56 e 58, em contraste com as demais, conforme mencionado por Kalinke (2019). A autora sugere que tais características podem estar ligadas à introdução de grupos funcionais nos poros da superfície dos materiais carbonáceos, resultantes da "destruição" das paredes dos poros. A presença de poros nesses materiais é crucial, pois influencia diretamente suas propriedades físicas, químicas e até mesmo suas aplicações práticas. Ao comparar essas amostras com outras apresentadas, percebe-se uma notável diferença na sua estrutura porosa, sugerindo variações significativas no processo de carbonização.

A Figura 57, ampliada em 2563x, destaca-se como notavelmente distinta das demais imagens apresentadas neste estudo. Sua aparência apresenta semelhanças com as pesquisas conduzidas por Ferreira (2018), nas quais a microalga *Monoraphidium* sp. e sua biomassa foram exploradas para a obtenção de diversos tipos de biocombustíveis. As micrografias fornecidas por esse autor exibem formas irregulares e tamanhos variados, com a biomassa ampliada assemelhando-se a fibras e bastonetes.

Ferreira (2018), afirma que essas ampliações utilizando biomassa de microalgas, onde as mesmas apresentam fibras e bastonetes, são bem comuns e estão de acordo com a literatura, ou seja, estes formatos são recorrentes e amplamente documentados na literatura científica.

No estudo conduzido por Batista *et al.* (2023) sobre a microalga *Chlorella* sp., foi observado que as Figuras 53 e 55 revelam picos cristalinos em determinadas estruturas da biomassa da co-cultura, especialmente na Figura 58. Essa descoberta assemelha-se aos estudos anteriores dos mesmos autores com a microalga *Chlorella* sp. Os picos cristalinos identificados, segundo os autores e conforme a literatura consultada, estão associados à presença de celulose na composição química das microalgas.

As Figuras 53, 54, 55 e 56 compartilham semelhanças com as imagens apresentadas por Batista *et al.* (2023), pois exibem uma predominância de superfícies irregulares (rugosas). As pesquisas de Batista *et al.* (2023) e Kalinke (2019) indicam que tais superfícies irregulares

e rugosas podem desempenhar um papel crucial ao servirem como pontos de ancoragem quando ambas as biomassas são empregadas como reforços em compósitos de matrizes poliméricas, onde esta seria uma outra aplicação a biomassa da co-cultura de microalgas e cianobactérias.

5.8. Reprodutibilidade dos experimentos

Com base nos dados obtidos até o momento sobre o rendimento de biomassa e óleo produzido a partir das co-culturas de microalgas e cianobactérias, a pesquisa sobre a otimização do meio de cultivo continuará utilizando os melhores parâmetros para maximizar o rendimento de óleo e, separadamente, o rendimento de biomassa, visando diferentes aplicações na área de biocombustíveis.

5.8.1. Reprodutibilidade dos experimentos visando quantidade de óleo e teor lipídico

Com base nos estudos realizados até o momento, incluindo os testes iniciais, planejamento experimental Döehlert e interpretação dos resultados utilizando software específico, além da consulta à literatura, foram definidos os seguintes dados sobre a biomassa seca, obtida após centrifugação, remoção de água e secagem; a quantidade de óleo gerada a partir da extração lipídica, medida pela pesagem das placas de Petri, e o teor de lipídios, calculado conforme a Equação 1. Os resultados indicaram que as melhores condições nutricionais para otimizar o rendimento lipídico são: fosfato (22,400g), nitrato (0,255g) e zinco (0,030g).

Em um frasco âmbar, foi adicionado 1 litro de água destilada juntamente com os nutrientes fosfato (22,400g), nitrato (0,255g) e zinco (0,030g), com o objetivo de realizar a reprodutibilidade dos experimentos.

Dessa forma, um novo meio de cultivo foi preparado e adicionado as seguintes quantidades para fosfato, nitrato e zinco. Onde seus resultados são apresentados na Tabela 14. Os parâmetros para este novo cultivo foram:

- Meio de cultivo: ASM1 (modificado, sem a presença de fosfato, nitrato e zinco);
- Presença de aeração;
- Espécies: *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp. em co-cultura;
- Tipo de reator: frascos de vidro boro 3.3 graduados;

- Tempo de cultivo: 21 dias.
- Adição de 5 mL da solução com fosfato, nitrato e zinco.

Posteriormente, a biomassa foi centrifugada e seca seguindo as metodologias de Oliveira (2019), Chiesa (2019) e Borges (2014). A extração lipídica foi realizada de acordo com o método estabelecido por Folch, Lees e Stoane-Stanley (1956), visando determinar a quantidade de óleo e o teor lipídico.

Tabela 14 – Resultados da reprodutibilidade experimental com novos valores para fosfato, nitrato e zinco visando quantidade de óleo e teor de lipídeos.

Ensaio	Biomassa seca (g/L)	Quantidade de óleo produzido por reator (g)	Teor de lipídeos extraído das células (%)
1	0,476	0,207	43,48
2	0,420	0,194	46,19
3	0,393	0,196	49,87

Fonte: próprio autor (2024).

Os resultados apresentados na Tabela 14 são bastante satisfatórios, indicando uma melhora significativa na porcentagem de lipídeos, com um aumento médio de 43,45%. Borges (2014) demonstrou que a otimização de um nutriente específico pode alterar os valores de biomassa e lipídeos em diferentes tipos de microalgas. Nos estudos de Borges (2014) e Chiesa (2019), o zinco foi o nutriente mais relacionado à redução de biomassa, com uma diminuição de mais de 50% após a otimização. Neste presente estudo, a redução média de biomassa foi de 56%.

Pesquisas recentes de Su *et al.* (2024) sobre o uso de micronutrientes em meios de crescimento de biomassa para microalgas visando a geração de energia limpa, demonstraram que a redução de zinco no meio de cultivo pode diminuir significativamente a produção de biomassa. Isso ocorre porque o zinco é um micronutriente essencial, desempenhando um papel crucial em vários processos fisiológicos dentro das microalgas, incluindo a função enzimática e a síntese de proteínas. No mesmo estudo, Su *et al.* (2024) enfatiza que a otimização do zinco é necessária e sua ausência no meio de cultivo pode afetar a saúde geral das culturas de microalgas.

5.8.2. Reprodutibilidade dos experimentos visando quantidade de biomassa

Ainda sobre a reprodutibilidade dos experimentos, os resultados indicaram que as melhores condições nutricionais para otimizar o rendimento lipídico são fosfato (22,400g), nitrato (0,170g) e zinco (0,480g).

Em um frasco âmbar, foram adicionados 1 litro de água destilada e os nutrientes fosfato (22,400g), nitrato (0,170g) e zinco (0,480g) para garantir a reprodutibilidade dos experimentos. As condições de cultivo seguiram as mesmas apresentadas no item 5.8.2, exceto pela extração lipídica e os teores de fosfato, nitrato e zinco. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados da reprodutibilidade experimental com novos valores para fosfato, nitrato e zinco visando quantidade de biomassa.

Ensaio	Biomassa seca (g/L)
1	1,024
2	1,315
3	1,222

Fonte: próprio autor (2024).

Com base nos resultados obtidos nas condições selecionadas, pode-se afirmar que a escolha das condições foi satisfatória. Os resultados indicaram que a análise conjunta das variáveis, especialmente o fosfato, utilizando o planejamento experimental, proporcionou uma melhoria média de 64,53% no teor de biomassa.

É importante ressaltar que aumentar a biomassa das microalgas para a produção de biocarvão é importante para melhorar a eficiência e a sustentabilidade do processo, além de proporcionar benefícios econômicos e ambientais significativos (Eloka; Inambao, 2017). Uma maior quantidade de biomassa permite otimizar as condições de produção do biocarvão, melhorando suas propriedades, como densidade energética, conteúdo de carbono fixo e estabilidade química, tornando-o um combustível mais eficiente e versátil (Grierson *et al.* 2009).

5.9. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias com adição de vitaminas

Para investigar a influência da adição de vitaminas no meio de cultivo da co-cultura de microalgas e cianobactérias, com o objetivo de aumentar o teor de lipídeos para produção

de biodiesel ou aumentar a produção de biomassa para geração de biochar, foram realizados 24 cultivos. Destes, 12 foram destinados à verificação dos rendimentos lipídicos e 12 à verificação dos rendimentos de biomassa. As vitaminas utilizadas nos experimentos foram tiamina, cianocobalamina e biotina. Os resultados obtidos são apresentados nos dois tópicos seguintes.

5.9.1. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias com adição de vitaminas visando quantidade de óleo e teor lipídico

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para biomassa seca, quantidade de óleo e teor lipídico para os experimentos realizados com a inserção de vitaminas na co-cultura de microalgas e cianobactérias. Vale ressaltar que o primeiro experimento com as vitaminas está relacionado com as melhores condições nutricionais para otimizar o rendimento lipídico com alterações nutricionais de fosfato (22,400g), nitrato (0,255g) e zinco (0,030g).

Tabela 16 - Concentração das vitaminas testadas com valores alterados de fosfato, nitrato e zinco para otimização de rendimento lipídico.

Vitamina	Condição	Nova concentração na solução estoque (mg/L)	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor lipídico (%)
Tiamina (B1)	Sem adição	0	0,568	0,236	41,54
	Metade	50	0,532	0,250	46,99
	Valor normal	100	0,486	0,290	59,67
	Dobro	200	0,578	0,188	32,52
Cianocobalamina (B12)	Sem adição	0	0,706	0,284	40,22
	Metade	0,25	0,628	0,132	21,01
	Valor normal	0,50	0,447	0,205	45,86
	Dobro	1,00	0,544	0,306	56,25
Biotina (B7)	Sem adição	0	0,550	0,191	34,72
	Metade	0,25	0,493	0,231	46,85
	Valor normal	0,50	0,512	0,234	45,70
	Dobro	1,00	0,568	0,291	51,23

Fonte: próprio autor (2024).

A variação de vitaminas nos meios de cultivo das co-culturas entre microalgas e cianobactérias revelou-se bastante positiva. Observou-se que a porcentagem mássica teve uma drástica redução, conforme discutido no item 5.8.1, onde a depleção de zinco afetou significativamente a quantidade de biomassa das co-culturas.

Além disso, algumas porcentagens lipídicas apresentaram um aumento significativo. Por exemplo, nos cultivos três (com valor normal para tiamina), quatro (com valor dobrado para cianocobalamina) e quatro (com valor dobrado para biotina), os resultados foram, respectivamente, 59,67%; 56,25% e 51,23%. Esses valores sugerem um aumento médio de 19,78% ao considerar apenas os melhores valores para otimização e compreensão dos efeitos das vitaminas nas co-culturas entre microalgas e cianobactérias.

Nos cultivos que envolveram a vitamina tiamina, o valor mais alto foi obtido com a adição da quantidade normal de tiamina no meio de cultivo. Os valores sem adição de vitamina e com metade da quantidade normal foram bastante semelhantes. Curiosamente, o cultivo com o dobro da quantidade normal de tiamina apresentou resultados inferiores aos demais. Para a vitamina cianocobalamina, o maior teor de lipídeos foi alcançado com o dobro da quantidade normal (1,00 mg/L). Os cultivos sem adição de vitamina e com a quantidade normal mostraram resultados semelhantes, enquanto a metade da quantidade normal resultou em um teor lipídico em torno de 21%.

Nos cultivos com biotina, o melhor resultado foi obtido com o dobro da quantidade de vitamina, atingindo mais de 50% de teor lipídico. As condições com metade e quantidade normal de biotina apresentaram resultados semelhantes, enquanto a ausência de adição de vitamina mostrou uma discrepância significativa.

Alguns autores que investigaram as microalgas e cianobactérias em monoculturas e co-culturas obtiveram resultados semelhantes aos deste estudo:

- Gou, Liu e Wu (2016) utilizaram a microalga *Nannochloropsis sp.* para a produção de lipídios e encontraram que a vitamina cianocobalamina foi bastante eficaz na produção de lipídios.
- Wang, Li e Li (2017) conduziram um estudo sobre os efeitos da vitamina cianocobalamina no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* e concluíram que a vitamina promoveu a produção de lipídios.
- Martins, Pires e Lima (2018) investigaram como a suplementação com vitamina tiamina pode aumentar o teor lipídico da microalga *Tetraselmis suecica*. O estudo revelou que a suplementação com tiamina resulta em um aumento significativo na produção de lipídios.

- Smith, Davis e Adams (2015) analisaram o impacto da biotina na produção de lipídios em *Scenedesmus obliquus* e concluíram que a biotina pode melhorar a produção de lipídios sob certas condições de cultivo.

É importante destacar que todas as vitaminas contribuíram para a produção lipídica, porém em condições específicas:

- A vitamina tiamina teve seu melhor rendimento com a concentração normal de 100 mg/L.
- A vitamina cianocobalamina apresentou o melhor rendimento com o valor dobrado, sendo 1 mg/L.
- A biotina também obteve seu melhor rendimento com o valor dobrado, sendo 1 mg/L.

Todas as respostas para o teor lipídico das concentrações das vitaminas mencionadas acima foram superiores a 50%, o que é bastante satisfatório para o presente estudo. Smith, Davis e Adams (2015) destacam que são necessárias otimizações ao usar vitaminas em meios de cultivo de microalgas, devido ao alto custo financeiro em larga escala. Em condições ótimas, é possível gerar uma quantidade maior de lipídios utilizando uma menor quantidade de vitaminas.

As otimizações e o planejamento estatístico são especialmente necessários ao utilizar co-culturas, pois, com duas espécies atuando em co-cultura e em um mesmo microambiente, a interpretação é mais complexa. É importante utilizar mais de uma vitamina em diferentes concentrações para verificar os valores de biomassa, óleo e porcentagem de óleo produzido nas células durante o co-cultivo. Esses valores fornecem uma orientação inicial, mas a concentração ideal pode depender da espécie específica de microalga, se é monocultura ou co-cultura e das condições de cultivo. Portanto, recomenda-se realizar experimentos preliminares para determinar a concentração mais eficaz para as condições específicas de cultivo.

5.9.2. Co-cultivo de microalgas e cianobactérias com adição de vitaminas visando rendimento de biomassa

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para biomassa seca com a co-cultura de microalgas e cianobactérias com a inserção de vitaminas na co-cultura de microalgas e cianobactérias e com as melhores condições nutricionais para otimizar o rendimento lipídico com fosfato (22,400g), nitrato (0,170g) e zinco (0,480g).

Tabela 17 - Concentração das vitaminas testadas com valores alterados de fosfato, nitrato e zinco para otimização de rendimento lipídico.

Vitamina	Condição	Nova concentração na solução estoque (mg/L)	Biomassa (mg/L)
Tiamina (B1)	Sem adição	0	1,171
	Metade	50	1,002
	Valor normal	100	1,207
	Dobro	200	1,425
Cianocobalamina (B12)	Sem adição	0	1,353
	Metade	0,25	1,288
	Valor normal	0,50	1,312
	Dobro	1,00	1,482
Biotina (B7)	Sem adição	0	1,170
	Metade	0,25	0,989
	Valor normal	0,50	1,302
	Dobro	1,00	1,199

Fonte: próprio autor (2024).

Os valores apresentados na Tabela 17 mostram que os melhores resultados foram obtidos com a duplicação das doses de tiamina (B1) e cianocobalamina (B12), alcançando 1,425 g/L e 1,482 g/L de biomassa seca, respectivamente. Embora as doses "normais" dessas vitaminas também tenham apresentado resultados positivos, não se destacaram tanto quanto as doses duplicadas, mas ainda foram notáveis com tiamina e cianocobalamina.

Os cultivos sem adição de vitaminas ou com metade da dose normal não apresentaram mudanças significativas nos valores de biomassa seca. Não houve grandes variações nos resultados para tiamina e cianocobalamina, sugerindo a necessidade de mais testes para explorar as possibilidades de aumentar a biomassa seca com a adição de vitaminas em co-culturas de microalgas e cianobactérias.

A adição de vitaminas ao meio de cultivo de microalgas influencia na produção de biomassa. Entre as vitaminas testadas, a cianocobalamina (B12) e a tiamina (B1) são mais eficazes em promover o aumento da biomassa. Enquanto a vitamina biotina (B7), não apresentou valores satisfatórios de rendimento de biomassa, sendo eles 1,170 g/L; 0,989 g/L; 1,302 g/L e 1,199 g/L.

Setyaningrum, Budiman e Suyono (2019) apresentaram em suas pesquisas que as vitaminas cianocobalamina e tiamina tiveram efeitos positivos no aumento da produtividade

de biomassa em microalgas tanto em monoculturas quanto em co-culturas. Eles também destacam que concentrações mais altas de vitaminas no meio de cultivo, como os 200 mg/L utilizados neste estudo, são mais eficazes para maximizar a produção de biomassa.

Kazamia *et al.* (2012) e Croft *et al.* (2006) demonstraram em seus estudos com microalgas em co-culturas que a adição das vitaminas cianocobalamina e tiamina resultou em interações mutualísticas positivas com as espécies microbiológicas cultivadas, promovendo o crescimento e aumentando a produção de biomassa.

Dessa forma, a adição de vitaminas no cultivo de microalgas e cianobactérias influenciou significativamente a produção de biomassa seca, com as vitaminas tiamina (B1) e cianocobalamina (B12) obtendo os melhores resultados quando suas doses foram duplicadas. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que mostram que doses elevadas dessas vitaminas contribuem para a produtividade de biomassa. Por outro lado, a biotina (B7) não apresentou rendimentos satisfatórios. Portanto, mais pesquisas são necessárias para explorar o potencial das vitaminas na otimização da produção de biomassa.

5.10. Análise imediata

Realizou-se a análise elementar após o cultivo das microalgas e cianobactérias em co-cultura, com a finalidade de observar os teores de umidade, material volátil, carbono fixo e cinzas da biomassa, após a otimização dos experimentos com adição de vitaminas visando o rendimento de biomassa. Os resultados obtidos foram comparados com a literatura específica e são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Análise imediata da co-cultura entre microalgas e cianobactérias em comparação com outras microalgas e cianobactérias presentes na literatura.

Autor	Espécie	Microrganismo utilizado		Análise elementar (%)			
		Micro-alga	Ciano-bactéria	Umidade	Material volátil	Carbono Fixo	Cinzas
Guerra (2024)	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Oscillatoria</i> sp.	X	X	6,19	81,41	10,47	5,70
Veloso (2017)	<i>Spirulina</i> sp.		X	6,68	86,74	6,09	7,17
Barbosa (2020)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	X		5,43	79,62	12,83	7,55
Andrade et al. (2018)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	X		6,00	80,01	12,45	7,54
Barbosa (2020)	<i>Chlorella</i> sp.	X		6,50	65,50	18,50	9,50
Koru et al. (2002)	<i>Spirulina</i> sp.		X	5,88	85,64	7,29	1,19
Wagenen et al. (2012)	<i>Nannochloropsis salina</i>	X		4,95	86,76	5,81	2,48
Trevisa, Branco & Arroyo (2019)	<i>Chlorella vulgaris</i>	X		8,52	-	-	3,27
Angelo (2014)	<i>Chlorella protothecoides</i>	X		5,39	-	-	3,00

Fonte: próprio autor (2024).

Os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados na literatura em termos de umidade, material volátil, carbono fixo e cinzas, mesmo considerando que os autores na sua grande maioria se concentraram exclusivamente em uma única espécie de microalga ou cianobactéria em monocultura.

A umidade é uma característica fundamental para a biomassa utilizada em processos como a pirólise. O teor de umidade inferior a 7%, na biomassa da co-cultura entre microalgas e cianobactérias, é considerado adequado para sua aplicação eficaz na pirólise e produção de biocarvão. É importante destacar que, na pirólise, a biomassa é utilizada seca para maximizar a eficiência energética durante a termodegradação. Este conceito é apresentado por Barbosa (2020), que utilizou a biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* em processos de produção de biocombustíveis, obtendo um teor de umidade de 5,43%.

Os componentes voláteis estão associados à parte da biomassa que se volatiliza durante o aquecimento. Um teor mais elevado de voláteis indica maior reatividade do material, aumentando a probabilidade de ignição. O carbono fixo representa a fração não

volátil que se decompõe para formar carvão. Portanto, um teor mais elevado de carbono fixo sugere um material menos reativo, permanecendo mais tempo no reator durante o processo. Para a obtenção de bio-óleo ou produtos químicos de interesse, as características desejáveis incluem um teor de voláteis acima de 70% e uma baixa porcentagem de carbono fixo, inferior a 15%, para serem considerados satisfatórios. (Barbosa, 2020), (Andrade *et al.* 2018).

A presença de quantidades altas de cinzas na biomassa reduz o poder calorífico, uma vez que os materiais minerais não fazem parte do processo de termodegradação (BRAND, 2010). A porcentagem reduzida de cinzas observadas neste trabalho, com um valor de 5,70%, evidencia resultados bastante satisfatórios. Veloso (2017) afirma que biomassas com teores inferiores a 10% são consideradas bastante positivas, pois indicam uma menor presença de componentes inorgânicos na biomassa, favorecendo um desempenho mais eficiente durante a pirólise.

O teor reduzido de cinzas, exemplificado pelos 8%, alinha-se com as conclusões de Veloso (2017), respaldando a eficácia da biomassa para aplicações termoquímicas. Essa característica é crucial, uma vez que a presença limitada de cinzas promove uma maior qualidade no biochar produzido e contribui para a maximização do rendimento de produtos valiosos na pirólise.

A biomassa das microalgas em co-cultura com cianobactérias mostra-se parcialmente adequada para a produção de biodiesel e biochar, com resultados semelhantes aos encontrados na literatura em termos de umidade, material volátil, carbono fixo e cinzas. A baixa umidade da biomassa é ideal para a pirólise, e os altos teores de componentes voláteis e baixos teores de carbono fixo são favoráveis para a produção de bio-óleo. A baixa porcentagem de cinzas melhora a eficiência da pirólise, alinhando-se com estudos anteriores.

5.11. Análise elementar

Os teores de oxigênio (O), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) foram analisados em testes conduzidos com uma amostra de 3 mg, e os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 19 a seguir.

Tabela 19 - Comparação dos valores da análise elementar obtidas pelo autor em relação a literatura.

Autor	Espécie	Microrganismo utilizado		Tipo de cultura		Elementos químicos relacionados (%)				
		Micro-alga	Ciano-bactéria	Mono-cultura	Co-cultura	C	H	N	S	O
Guerra (2024)	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Oscillatoria</i> sp.	X	X		X	46,17	6,51	7,29	0,99	39,04
Veloso (2017)	<i>Spirulina</i> sp.		X	X		41,68	6,36	6,64	1,42	40,90
Barbosa (2020)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	X		X		46,63	6,51	11,31	0,32	27,68
Andrade et al. (2018)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	X		X		44,31	6,74	10,58	1,77	29,06
Barbosa (2020)	<i>Chlorella</i> sp.	X		X		50,20	7,25	9,30	0,00	33,20
Koru et al. (2002)	<i>Spirulina</i> sp.		X	X		42,26	5,86	3,47	1,15	47,26
Wagenen et al. (2012)	<i>Nannochloropsis salina</i>	X		X		55,16	6,87	2,73	1,27	33,97

Fonte: próprio autor (2024).

A análise elementar revelou que os teores de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O) identificados estão em conformidade com dados previamente relatados para co-culturas entre microalgas e cianobactérias. Isso é notável, considerando que os autores citados na literatura geralmente se concentram em uma única espécie de microalga ou cianobactéria em monocultura.

O presente estudo apresenta valores de 46,17 em relação a quantidade de carbono na co-cultura de microalgas e cianobactérias, esses valores são semelhantes a Barbosa (2020), Andrade *et al.* (2018). Os dois autores em questão utilizaram as microalgas para o processo de pirólise e produção de diferentes biocombustíveis.

Valores acima de 40% podem indicar uma maior quantidade de lipídios, que são os principais precursores do biodiesel. Mais lipídios resultam em uma maior quantidade de óleo. Outro fator importante é que essa quantidade de carbono influencia na viscosidade, ponto de fusão e estabilidade oxidativa, que são características muito importantes para a qualidade do biodiesel (Brennan & Owende, 2010), (Demirbas & Dermibas, 2010).

Esses valores também influenciam na qualidade do biochar. Um teor maior de carbono fixo no biochar aumenta sua estabilidade durante a pirólise, melhora a retenção de água e nutrientes, proporciona maior poder calorífico para combustão e aumenta a eficiência

como agente de melhoria do solo (Lehmann & Joseph, 2015), (Mata; Martins; Caetano, 2010), (Mohan *et al.* 2014).

Os resultados sobre o elemento hidrogênio são semelhantes aos encontrados por outros autores. Neste trabalho, os valores para o hidrogênio presente na biomassa da co-cultura de microalgas e cianobactérias foram de 6,51%. Veloso (2017) relatou um valor de 6,36% para a cianobactéria *Spirulina* sp., enquanto Barbosa (2020) encontrou 6,51% na microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Andrade *et al.* (2018) apresentaram um valor de 6,74% para a mesma microalga, e Wagenen *et al.* (2012) apresentaram 6,87% para a cianobactéria *Nannochloropsis salina*, todos em cultivos de monocultura.

Para produção de biodiesel o elemento hidrogênio que está presente na biomassa de microalgas e cianobactérias contribui para a formação de hidrocarbonetos durante o processo de transesterificação. Este elemento é muito importante para saturação de ácidos graxos, dessa forma, valores mais altos de hidrogênio na biomassa geralmente são melhores, pois aumentam a saturação dos ácidos graxos, melhorando a estabilidade oxidativa e qualidade do biodiesel (Brennan & Owende, 2010), (Mata; Martins; Caetano, 2010), (Lehmann & Joseph, 2015).

A presença do hidrogênio na biomassa da co-cultura visando a produção de biochar afeta principalmente na composição química do biochar. Este elemento, durante a pirólise, contribui para formação de hidrocarbonetos voláteis, dessa forma, influenciando na estrutura do carbono fixo do biochar. Sabendo disso, valores mais baixos de hidrogênio são melhores, pois resultam em um maior teor de carbono fixo, aumento a estabilidade e eficiência do biochar (Liu; Zhang, 2009), (Xu; Chen, 2013).

Os resultados sobre o elemento nitrogênio são de 7,29%, o valor mais próximo é o de Veloso (2017) com a cianobactéria *Spirulina* sp. com o valor de 6,64%. A concentração de nitrogênio, atingindo 7,29%, é atribuível à elevada presença de proteínas nas microalgas e cianobactérias. Vale ressaltar que a presença da cianobactéria presente na co-cultura, de acordo com Veloso (2018), faz com que a biomassa da co-cultura apresente um maior teor de nitrogênio, pois o gênero da cianobactéria (*Oscillatoria*), geralmente possui a facilidade em assimilação de nitrogênio, dessa forma, se incorporando na biomassa posteriormente.

Para a produção de biodiesel os valores de nitrogênio presentes na biomassa podem levar a formação de compostos nitrogenados no óleo extraído, esses compostos são indesejáveis no biodiesel e causar problemas durante a combustão, podendo causar problemas durante a combustão e reduzir a qualidade do biodiesel. Outro fator importante é que em grande quantidade este elemento pode aumentar a acidez deste biocombustível contribuindo

para a formação de óxidos de nitrogênio (Brennan & Owende, 2010) e (Lehmann & Joseph, 2015).

Em relação ao biocarvão o elemento nitrogênio afeta na composição química do biochar, podendo influenciar suas propriedades físico-químicas, sabendo disso, valores altos destes elementos são benéficos para aplicações em solos pobres em nutrientes. No caso do uso do biochar na área dos biocombustíveis valores mais baixos, deixam o biochar mais estável durante a pirólise (Xu; Chen, 2013).

Os resultados sobre o elemento enxofre são semelhantes aos encontrados por outros autores. Neste trabalho, os valores para o enxofre presente na biomassa da co-cultura de microalgas e cianobactérias foram de 0,99%. Koru *et al.* (2002) apresentou o valor de 1,15% com a cianobactéria *Spirulina* sp., enquanto Wagenen *et al.* (2012) encontrou 1,27% com a microalga *Nannochloropsis salina*, ambos em monoculturas.

Altos valores de enxofre são indesejáveis para produção de biodiesel, onde este elemento pode fazer com que este biocombustível não atenda aos padrões regulamentares de qualidade, pois em grande quantidade apresenta problemas de corrosão e emissões de SO₂, por exemplo (Brennan & Owende, 2010) e (Lehmann & Joseph, 2015).

Para produção de biochar o enxofre em pequenas quantidades é mais benéfico pois, durante o processo de pirólise o enxofre sobre a volatilização e forma gases sulfurados. Outro fator importante é que em grande quantidade este elemento afeta a quantidade do biochar (Xu; Chen, 2013).

Os valores apresentados de oxigênio são de 39,04%, que estão bem próximos a Veloso (2017) que utilizou a cianobactéria *Spirulina* sp. com o objetivo de realizar o processo de pirólise na biomassa de microalgas e cianobactérias. Outro resultado semelhante foi o de Wagenen *et al.* (2012) que utilizou a microalga *Nannochloropsis salina* para produção de ácidos graxos utilizando diferentes efeitos de luz e temperatura para seus rendimentos.

Wagenen *et al.* (2012) apresenta que as porcentagens encontradas por ele, em torno de 33,97%, são consideradas altas, onde valores menores que 30% são considerados ideais para refletir positivamente na qualidade do bio-óleo. A presença oxigênio no óleo pode prejudicar a qualidade do biodiesel. Compostos oxigenados podem aumentar a acidez e a instabilidade do óleo, levando à formação de produtos indesejáveis durante a combustão. Isso pode reduzir a sua eficiência e durabilidade. Sobre a síntese de biochar Xu; Chen (2013) apresentam que, valores baixos de oxigênio são desejáveis, pois produzem um biochar mais estável, com maior teor de carbono fixo e maior poder calorífico.

A análise elementar é fundamental, pois revela o perfil da biomassa e suas características para a produção de biocombustíveis. A Tabela 20 apresenta uma síntese comparativa dos valores obtidos neste estudo com os da literatura, permitindo verificar se a biomassa da co-cultura de microalgas e cianobactérias é adequada para a produção de biodiesel e biochar.

Tabela 20 – Síntese dos valores da análise elementar obtidos pelo autor comparados com a literatura para produção de biodiesel e biochar.

Elementos químicos	Resultados do autor (%)	Valor satisfatório ou insatisfatório		Justificativa
		Biodiesel	Biochar	
C	46,17	S	S	- Valores mais altos de C indicam maior quantidade de lipídios. - Maior teor de carbono fixo no biochar aumenta sua estabilidade durante a pirólise.
H	6,51	I	S	- Valores mais altos de hidrogênio na biomassa melhoram a estabilidade oxidativa e qualidade do biodiesel. - Valores mais baixos de hidrogênio aumentam a estabilidade e eficiência do biochar.
N	7,29	S	S	- Grande quantidade deste elemento aumenta a acidez do biocombustível e a formação de óxidos de nitrogênio. - Valores mais baixos tornam o biochar mais estável durante a pirólise.
S	0,99	S	S	- Altos valores de enxofre no biodiesel podem causar problemas de corrosão, emissões de SO ₂ e não atender aos padrões de qualidade. - Pequenas quantidades de enxofre são mais benéficas para a produção de biochar, pois evitam a formação excessiva de gases sulfurados durante a pirólise.
O	39,04	I	I	- Compostos oxigenados aumentam a acidez e instabilidade do óleo, formando produtos indesejáveis e reduzindo eficiência e durabilidade. - Valores baixos de oxigênio são desejáveis para biochar, resultando em maior estabilidade, maior teor de carbono fixo e maior poder calorífico.

* S = satisfatório. I = insatisfatório.

Fonte: próprio autor (2024).

Os valores apresentados na Tabela 20 indicam que, para a produção de biodiesel, os teores de carbono, nitrogênio e enxofre são satisfatórios, enquanto os de hidrogênio e oxigênio são insatisfatórios. Para a produção de biochar, os teores de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre são satisfatórios, mas o de oxigênio é insatisfatório.

Em relação à análise elementar, os valores apresentados mostram que a biomassa das microalgas em co-cultura com cianobactérias possui um perfil elementar que a torna parcialmente adequada para a produção de biodiesel e biochar. Esta biomassa tem um grande potencial biotecnológico na área dos biocombustíveis. No entanto, para melhorar a produção de biodiesel e biochar, são necessários novos testes para otimizar os níveis que foram considerados insatisfatórios para cada aplicação.

5.12. Análise termogravimétrica (TGA)

A partir do método de secagem e maceração da biomassa, conduziu-se análises termogravimétricas (TGA) em duas condições distintas: atmosfera inerte e ar sintético. Os resultados dessas análises geraram uma curva representando o declínio térmico, a qual fornece informações sobre a decomposição da amostra em relação à temperatura. Esses dados permitem a determinação dos parâmetros de estabilidade térmica de diversos materiais, como óleo, gorduras in natura e biodiesel.

Adicionalmente, a TGA tem sido empregada como ferramenta para investigar o comportamento da combustão da biomassa. A combustão é caracterizada pela volatilização inicial e queima dos componentes voláteis do carvão, seguida por uma combustão mais lenta (Silva, 2022 c).

A curva termogravimétrica (TGA) foi obtida para a biomassa proveniente das co-culturas, conforme ilustrado na Figura 59 - A. De modo geral, as curvas TGA revelaram três eventos distintos: o primeiro ocorrendo acima da temperatura ambiente até 176 °C, o segundo entre 176 e 391 °C, e o último de 391 a 600 °C. No co-cultivo de microalgas e cianobactérias, observou-se a decomposição de 79% de sua biomassa ao final do processo com ar sintético.

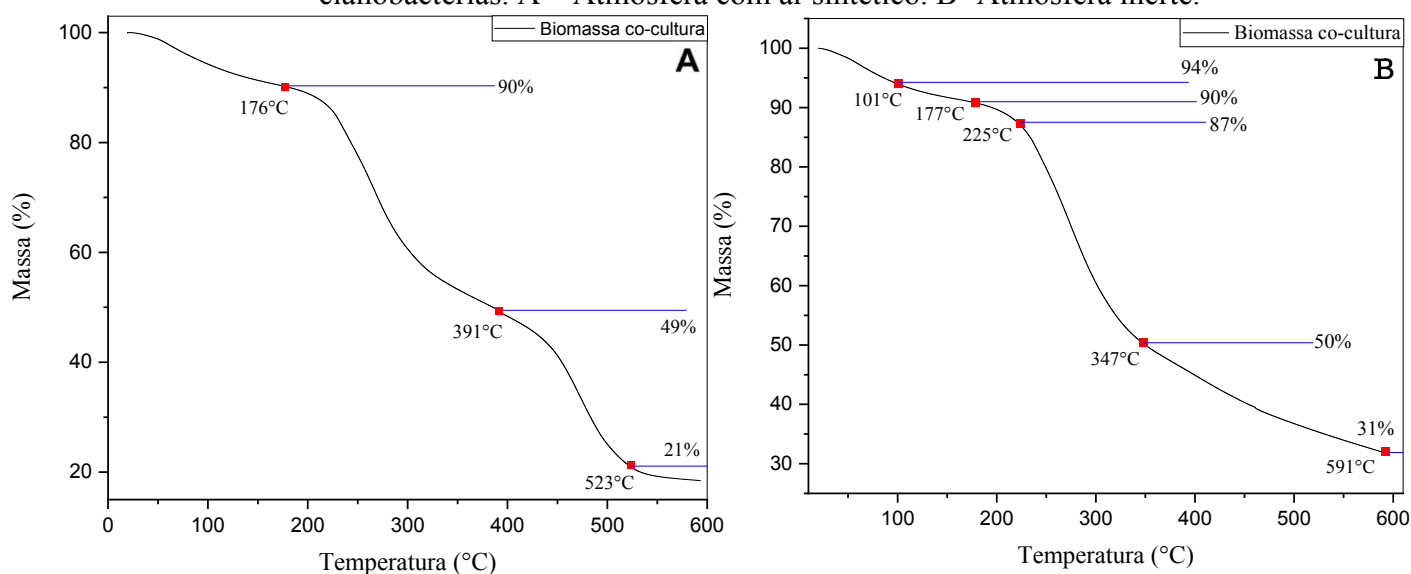
O primeiro evento evidenciado na curva TGA, que ocorre acima da temperatura ambiente até 176°C, comumente corresponde à perda de água e compostos voláteis presentes na biomassa. Esta fase, conhecida como perda de umidade, caracteriza-se pela redução da massa da amostra devido à evaporação de água e outros compostos de baixa volatilidade presentes na biomassa.

O segundo evento, situado na faixa de temperatura de 176°C a 391°C, representa a decomposição de componentes orgânicos mais complexos na biomassa. Nesta etapa, ocorre a volatilização e combustão dos componentes voláteis, como óleos, gorduras e outros compostos orgânicos, resultando em uma perda adicional de massa na curva termogravimétrica.

O último evento, ocorrendo entre 391°C e 600°C, representa a etapa de combustão lenta. Neste estágio, os componentes residuais da biomassa, como carvão e outros materiais carbonizados, são submetidos a uma combustão mais lenta e controlada.

O co-cultivo de microalgas e cianobactérias exibiu uma decomposição de 79% de sua biomassa ao término do processo com ar sintético. Isso implica que, ao ser submetida à análise termogravimétrica em atmosfera de ar sintético, a biomassa das co-culturas perdeu 79% de sua massa total devido à decomposição térmica.

Figura 59 - Análise termogravimétrica da biomassa pura da co-cultura entre microalgas e cianobactérias. A – Atmosfera com ar sintético. B- Atmosfera inerte.



Fonte: próprio autor (2024).

A análise termogravimétrica destaca-se como uma técnica crucial para determinar os parâmetros de estabilidade térmica de diferentes materiais. A interpretação da curva TGA permite a identificação das temperaturas associadas às principais fases de decomposição e combustão da biomassa, oferecendo informações valiosas sobre sua composição e comportamento térmico.

Além disso, a TGA serve como ferramenta essencial para investigar o comportamento da combustão da biomassa. Os dados resultantes da TGA são empregados para avaliar a

eficiência da queima de biomassa como fonte de energia e para aprofundar a compreensão dos processos envolvidos na liberação de calor durante a combustão.

No contexto de óleos, gorduras in natura e biodiesel, a TGA emerge como uma abordagem útil para avaliar a estabilidade térmica e o comportamento de decomposição desses materiais em diversas condições, proporcionando relevância para aplicações industriais e de energia renovável.

Silva (2022 c) identifica em seus estudos (com cianobactérias) valores semelhantes aos apresentados neste estudo nas análises de TGA com ar sintético. Das espécies utilizadas em seu estudo, três apresentaram o perfil termogravimétrico da amostra da co-cultura de microalgas e cianobactérias. As espécies foram *M. indicum*, *Geitlerinema* sp. e *A. densus*, as três espécies apresentaram os três eventos principais da amostra de biomassa pura da co-cultura, como mostra a Figura 59 – A.

A biomassa da co-cultura a partir do TGA com atmosfera inerte (Figura 59-B), apresentou eventos térmicos diferentes em comparação com o gráfico da Figura 58 – A. Os eventos ocorrem com temperaturas distintas com, 101, 177, 225, 347 e 591°C com a decomposição da biomassa de 69%. As espécies que apresentam valores semelhantes ao TGA com atmosfera inerte foram *D. spinosus*, *K. aperta*, *Nostoc* sp. (Silva, 2022 c).

Ainda é necessário a realização das curvas termogravimétricas derivadas para ambos os gráficos da Figura 59, para discussões mais integralizadas sobre eventos térmicos, Tonset (temperatura inicial extrapolada do evento), Tendset (temperatura final extrapolada) e T_{máx} (temperatura de degradação na taxa máxima de perda de massa).

As informações fornecidas pelo TGA com atmosfera inerte (Figura 59-B) parecem indicar que a decomposição da biomassa da co-cultura ocorre em temperaturas distintas das encontradas no gráfico da Figura 59-A, que foi realizado com ar sintético. Esse resultado sugere que a atmosfera utilizada durante a análise térmica tem influência sobre os eventos térmicos da biomassa.

Além disso, essas análises termogravimétricas podem fornecer informações valiosas para aplicações práticas, como a utilização da biomassa para a produção de biocombustíveis, compostos bioativos ou outros produtos de interesse industrial.

Portanto, a realização das curvas termogravimétricas derivadas é essencial para enriquecer a discussão e fornecer uma visão mais completa sobre os eventos térmicos das espécies estudadas, suas características e potenciais aplicações.

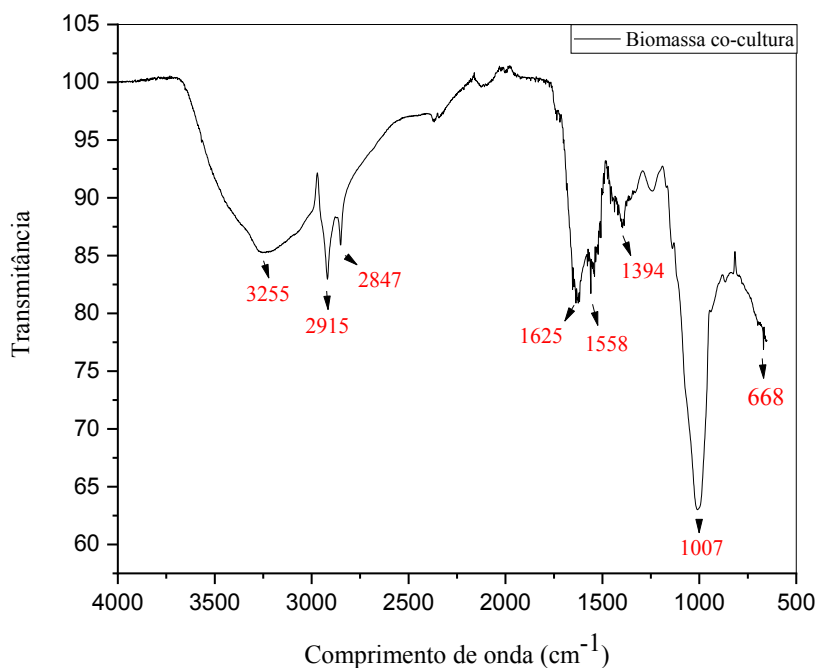
5.13. Espectroscopia na região do infravermelho

A técnica de espectroscopia no infravermelho demonstra eficácia na identificação de grupos funcionais e novas ligações formadas nos bioprodutos provenientes do co-cultivo entre microalgas e cianobactérias. Neste estudo, a espectroscopia no infravermelho foi empregada de maneira qualitativa para avaliar as características da biomassa da co-cultura, bem como o óleo derivado de microalgas e cianobactérias, e o biodiesel in situ.

Os espectros na região do infravermelho da biomassa da co-cultura são apresentados na Figura 60, onde as bandas de absorção foram identificadas nas faixas de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , correspondendo a carboidratos, proteínas e lipídios. A região espectral de 3255 cm^{-1} reflete os aglomerados de proteína (ligação N-H) e água (ligação O-H) presentes na biomassa pura. Na faixa de 3000 a 2800 cm^{-1} , destacam-se trechos irregulares de hidrocarbonetos indicativos de ligações CH₂, associadas aos lipídios. As bandas em 2915 e 2847 cm^{-1} representam CH₂ e CH₃, referentes aos grupos metileno de lipídios e ácidos graxos. Na faixa de 1700 a 1600 cm^{-1} , observa-se C = O de ésteres, relacionados à carbonila de ésteres de ácidos graxos, como os triglicerídeos (Silva, 2022 c).

Os estudos de Silva (2022 c) revelam resultados análogos aos apresentados neste estudo, em relação à espectroscopia no infravermelho em diferentes espécies de microalgas e cianobactérias cultivadas em fotobiorreatores cilíndricos. A análise foi realizada em amostras de biomassas secas e puras. Dentre as dez espécies estudadas por Silva (2022 c), aquelas que demonstraram resultados semelhantes aos apresentados na Figura 60 foram as espécies *K. aperta*, *N. gaditana* e *Diatomacea* sp.

Figura 60 - Espectros obtidos na região do infravermelho para biomassa de microalgas e cianobactérias cultivadas em co-cultura.

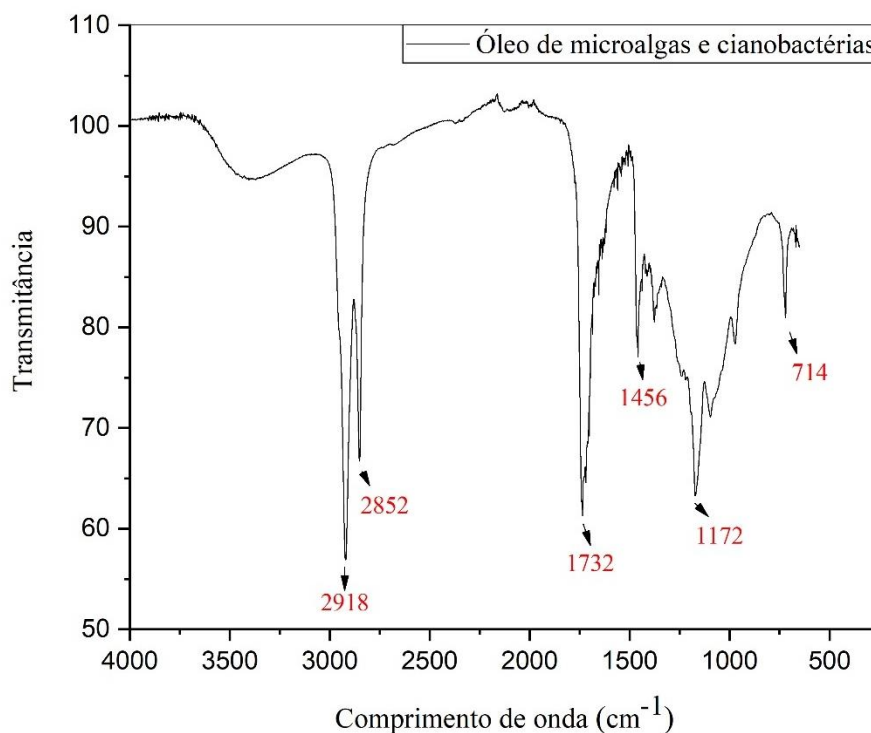


Fonte: próprio autor (2024).

A Figura 60 exibe espectros dos materiais lipídicos extraídos das co-culturas de microalgas e cianobactérias. A matéria-prima obtida revelou espectros com bandas de vibração associadas à presença de grupos alcanos, localizadas nas faixas de 2852 e 2918 cm^{-1} , referentes ao alongamento dos grupos CH. Além disso, os espectros indicaram uma banda média relacionada à extensão axial do grupo éster (C-O) em 1172 cm^{-1} , juntamente com a presença de uma banda atribuída ao grupo $(\text{CH}_2)_n$, identificada em 714 cm^{-1} .

Resultados semelhantes na região do infravermelho foram apresentados nos estudos de Rós (2012), que investigou os espectros de matérias-primas lipídicas de três espécies distintas de cianobactérias a *M. aeruginosa*, *Synechococcus* sp. e *Trichormus* sp.

Figura 61 - Espectros obtidos na região do infravermelho para o óleo de microalgas e cianobactérias cultivadas em co-cultura.



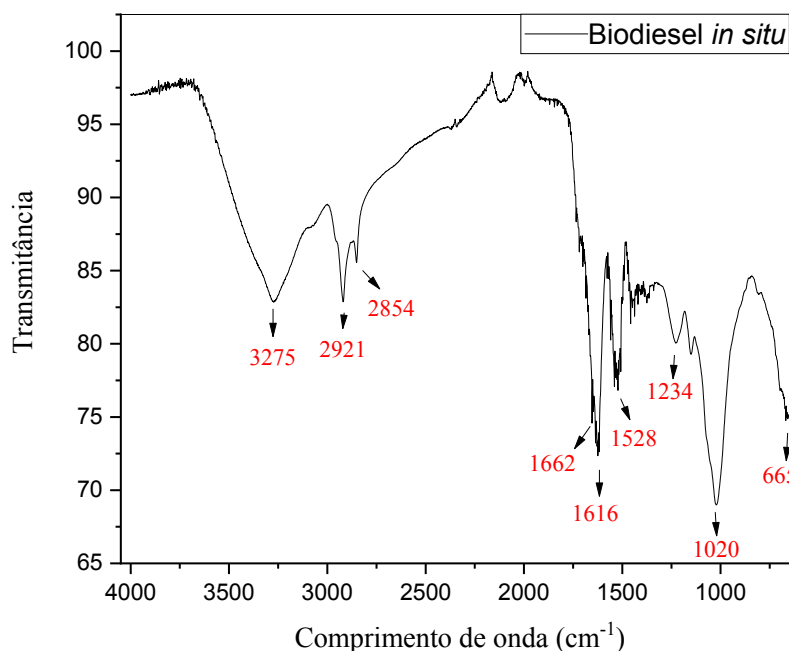
Fonte: próprio autor (2024).

O estiramento vibracional das unidades de carbonila (C=O) de ésteres foi igualmente identificado, manifestando-se na faixa de 1732 cm^{-1} com picos notavelmente pronunciados, consolidando a presença de triglicerídeos nas amostras lipídicas. As bandas associadas às vibrações da ligação C=C-C-O foram observadas entre 1290 e 1040 cm^{-1} , evidenciando duas vibrações assimétricas acopladas curtas. Outra característica destacada do espectro é a presença de bandas robustas na região de 3000 - 2750 cm^{-1} , relacionadas às propriedades de deformação axial dos grupos OH (RÓS, 2012).

Visando avaliar as amostras de biodiesel etílico in situ da co-cultura e quantificar os principais grupos funcionais presentes, a Figura 61 exibe o espectro obtido.

Dias (2019) compartilha em seus estudos sobre a síntese de biodiesel in situ a partir da microalga *Scenedesmus* sp. resultados notavelmente semelhantes aos apresentados neste estudo. Rós (2012), ao identificar duas espécies de cianobactérias, *Synechococcus* sp. e *M. aeruginosa*, também destaca resultados similares aos do presente estudo.

Figura 62 - Espectros obtidos na região do infravermelho do biodiesel *in situ* de microalgas e cianobactérias cultivadas em co-cultura.



Fonte: próprio autor (2024).

Diversas bandas identificáveis foram observadas, associadas a estruturas conhecidas de ésteres. Na região em torno de 3000 cm^{-1} , os trechos assimétricos relacionam-se às ligações (C-H) ($\nu_{\text{C-H}} = 2854\text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{C-H}} = 2921\text{ cm}^{-1}$), gerando também trechos simétricos e assimétricos em 1528 cm^{-1} e 1234 cm^{-1} , enquanto o alongamento em 665 cm^{-1} refere-se às ligações fora do plano (C-H) (Dias, 2019).

Foi observado um forte alongamento característico do grupo carbonila (C=O) em 1662 cm^{-1} , e em 1234 cm^{-1} , a deformação por grupo (C-C (C = O)-O). O pico intenso em 10200 cm^{-1} indica o deslocamento de tração relacionado ao volume (C-O) para o éster. As vibrações de estiramento do CH₃, CH₂ e CH aparecem em 2921-2854 (RÓS, 2012).

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nos experimentos, as seguintes conclusões podem ser destacadas:

- O uso de microscópio eletrônico e estereomicroscópio ajudou a identificar e classificar as espécies microbiológicas em reatores contaminados. Com apoio das UFVJM e UTFPR, foram identificadas a microalga *Chlorella* sp. e a cianobactéria *Oscillatoria* sp.
- As espécies demonstraram uma adaptação positiva no sistema de co-cultivo, com aumento de biomassa e rendimento lipídico. No entanto, mais testes são necessários para validar e comparar esses resultados com culturas individuais e outras co-culturas.
- O co-cultivo de *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp. resultou em um aumento de 64,53% na biomassa seca, beneficiando a produção de biochar. Os rendimentos lipídicos atingiram aproximadamente 30% nos primeiros experimentos, com um aumento médio de 43,45% após a otimização experimental.
- A otimização nutricional no co-cultivo mostrou-se eficaz, resultando em altos valores de fosfato (22,400 g/L), nitrato (0,255 g/L) e zinco (0,030 g/L) para rendimento lipídico. Para biomassa, os valores finais foram fosfato (22,400 g/L), nitrato (0,170 g/L) e zinco (0,480 g/L).
- As vitaminas tiamina, cianocobalamina e biotina não apresentaram diferenças significativas entre elas, porém a utilização de vitaminas nos co-cultivos teve um maior rendimento lipídico, com melhores valores sendo 100 mg/L para tiamina, 1 mg/L para cianocobalamina e 1 mg/L para biotina. Para rendimento de biomassa, a tiamina e a cianocobalamina foram mais eficazes, com melhores valores de 200 mg/L. Novos testes são necessários para entender melhor o impacto das vitaminas na síntese de biomassa e lipídios.
- As análises (imediata e elementar) indicam que a biomassa da co-cultura é adequada para a produção de biocombustíveis, mas a escolha do biocombustível adequado é crucial para garantir um rendimento satisfatório.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Cultivar as espécies *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp. em monoculturas, utilizando os mesmos parâmetros, e comparar os resultados com os obtidos no presente estudo.
- Realizar um planejamento experimental para avaliar o potencial das vitaminas de forma mista em um mesmo reator e sua influência nos rendimentos de biomassa e lipídios.
- Investigar outras aplicações do biochar produzido a partir da biomassa de microalgas e cianobactérias.

REFERÊNCIAS

Aghbashlo, Mortaza; PENG, Wanxi; TABATABAEI, Meisam; KALOGIROU, Soteris A.; SOLTANIAN, Salman; HOSSEINZADEH-BANDBAFHA, Homa; MAHIAN, Omid; LAM, Su Shiung. Machine learning technology in biodiesel research: a review. **Progress In Energy And Combustion Science**, [S.L.], v. 85, p. 100904, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2021.100904>.

AL-HUMAIRI, Shurooq T.; LEE, Jonathan G. M.; SALIHU, Musa; HARVEY, Adam P. Biodiesel Production through Acid Catalyst In Situ Reactive Extraction of *Chlorella vulgaris* Foamate. **Energies**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 1-20, 20 jun. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en15124482>.

Andrade, Laiane Alves de; BARBOSA, Janaína Miranda; KYRIAKIDIS, Yanne Novais; BARROZO, Marcos Antonio de Souza; Vieira, Luiz Gustavo Martins. Aplicação da energia solar na pirólise catalítica In Situ de microalgas / Application of solar energy in In Situ catalytic pyrolysis of microalgae. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 15209-15222, 27 fev. 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n2-442>.

ANDRADE, L. A.; BATISTA, F. R. X.; LIRA, T. S.; BARROZO, M. A. S.; VIEIRA, L. G. M. Characterization and product formation during the catalytic and non-catalytic pyrolysis of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Renewable Energy**, v. 119, p. 731–740, 2018a. doi:10.1016/j.renene.2017.12.056.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Mapa dinâmico**: Produtores de biocombustíveis. 2020. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMjNINWI1NGEtZjU5MC00NjFjLWJiMDYtNzY3NGY0YmI3NjQ5IiwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTl0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzIxMyJ9>>. Acesso em: 11 mai. 2022.

Angelo, Elisangela Andrade; Andrade, Diva Souza; COLOZZI FILHO, Arnaldo. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 115-134, 5 fev. 2014. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2014v35n2p125>.

Antunes, Jorge T.; Leão, Pedro N.; Vasconcelos, Vítor M. Influence of Biotic and Abiotic Factors on the Allelopathic Activity of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* Strain LEGE 99043. **Microbial Ecology**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 584-592, 5 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0061-7>.

Assis Neto, Djalma Queiroga de. **Potencial das microalgas *Chlorella vulgaris* E *Dunaliella tertiolecta* butcher para produção de biocombustíveis e biorremediação de efluente doméstico e rejeito de dessalinização**. 2022. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Gestão de Recursos Naturais, Instituto de Engenharia e Gestão de Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2022.

AUD, Bárbara Nascimento. **Modificação química do polipropileno através da introdução de grupos sulfônicos para aplicação como catalisador ácido em reações de esterificação, visando a produção de biodiesel**. 2022. 237 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

Barbieri, Bruna. **Inovações sustentáveis em biocombustíveis no Brasil e a substituição dos combustíveis fósseis: revisão sistemática da literatura**. 2021. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Engenharia Química, Instituto de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2021.

BATISTA, Micaela Perez da Silva; CARDINOT, Ana Claudia de Almeida; MOTA, Izabel de Oliveira; TAGLIAFERRO, Gerônimo Virginio; BANDEIRA, Cirlene Fourquet; MONTORO Sérgio Roberto. (2023). **Caracterização de biomassas constituídas de microalgas *Chlorella* sp para possível aplicação como reforços em compósitos poliméricos**. Congresso Brasileiro De Ciências E Saberes Multidisciplinares, (2). Recuperado de <https://conferenciasunifoa.emnuvens.com.br/tc/article/view/1062>

Borges, Wesley da Silva. **Produção de bio-óleo empregando microalgas em diferentes meios de cultivo**. 2014. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BRAND, M. A. **Energia de Biomassa Florestal**. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 2010.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 557-577, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.

CARDOSO, Aderlânio da Silva; Vieira, Gláucia Eliza Gama; MARQUES, Anelise Kappes. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.

CARDOSO, L. G. et al. *Spirulina* sp. as a bioremediation agent for aquaculture wastewater: production of high added value compounds and estimation of theoretical biodiesel. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 1, p. 254-264, ago., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10153-4>. Acesso em: 22 nov. 2023.

Carvalho, Clara Toscano de. **Avaliação e análise da utilização de resíduos para produção de biocombustíveis**. 2022. 71 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia Química, Instituto de Ciências Ambientais, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2022.

Carvalho, Letícia Alves Martins de; POMPEI, Caroline Moço Erba; BOLZANI, Hugo Renan; Silva, Gustavo Henrique Ribeiro da. Monitoramento da biomassa e da comunidade de microalgas e cianobactérias nativas de esgoto de alta carga em fotobiorreator do tipo flat panel. **Environmental: Science & Technology Innovation**, Bauru, v. 1, n. 1, p. 13-30, 30 jul. 2022.

Cartas, Liliana Carrillo. **Isolamento e cultivo de microalgas em resíduo líquido do processamento da mandioca: manipueira**. 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2018.

CASTRO, Nicolle Alves Monteiro de. **BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL: regulação e políticas públicas para mitigação de gases de efeito estufa**. 2023. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Agronegócio, Escola de Economia de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 2023. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10438/34348>. Acesso em: 06 jan. 2024.

CAVALCANTI, Davi de Lima. **Sequestro de carbono e geração de energia alternativa por célula a combustível fotossintética de *Chlorella vulgaris* com produção secundária de biodiesel e carotenóides**. 2020. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/41997>. Acesso em: 11 jan. 2024.

Chiesa, Jaqueline Elise Garcia. **Avaliação dos efeitos causados pelas diferentes condições de cultivo nas microalgas *Snedesmus sp.* e *Chlorella sp.* Mediante a potencialização de teor lipídico**. 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Biocombustíveis, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

CLARK, J. H.; LUQUE, R.; MATHARU, A. S. (2012). Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, 3(1), 183–207.

CELENTE, Gleison de Souza. **Uso combinado de microalgas e Wetlands construídos com fluxo vertical como tratamento terciário descentralizado de efluente sanitário**. 2018. 104 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado e Doutorado) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2018.

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

CORDEIRO, Raquel da Silva. **Cianobactérias isoladas de lagos naturais do Parque Estadual do Rio Doce-MG potencialmente produtoras de biocombustível**. 2015. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Demirbas, Ayhan. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, Trabzon, v. 35, p. 4661-4670, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2007.04.003>

Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (2010). Algae energy: Algae as a new source of biodiesel. **Springer Science & Business Media**. DOI: 10.1007/978-1-84996-050-2

Dextro, Rafael Barty. Growth dynamic on a co-cultivation of two Chlorophyta microalgae exposed to copper. **Acta Limnoligica Brasiliensia**, v. 33, n. 16, p. 1 – 12, 2021.

Duarte, Victória Huch; VALENTINI, Marlon; Santos, Gabriel Borges dos; NADALETTI, Willian Cezar; Vieira, Bruno Muller. Biocombustíveis: uma revisão sobre o panorama histórico, produção e aplicações do biogás. **Revista Ambientale**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 22-34, 22 jun. 2022. Universidade Estadual de Alagoas.
<http://dx.doi.org/10.48180/ambientale.v14i2.371>.

ELICKER, Carolina; FLORES, Chayane P.; Santos, Marco Aurélio Z. dos; COLEPICOLO NETO, Pio; PEREIRA, Claudio M. P. de. Study of the Use of Cyanobacterial Biomass as Feedstock for Synthesis of Biodiesel Through In Situ Esterification Reaction. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 2497-2508, 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150149>.

ELVAS, Thaísa Magalhães. **Estudo do processo adsorptivo utilizando-se biocarvão e carvão ativado para remoção por adsorção de benzeno, tolueno e p-xileno**. 2022. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Engenharia Química, Departamento Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ELISBÃO, Andressa; DOGE, Jonas da Silva. XXIII FEIRA DO CONHECIMENTO TECNOLÓGICO E CIENTÍFICO, 23., 2022, Rio do Sul. **Plasticidade reprodutiva da mosca-do-figo (*Zaprionus indianus*: diptera) sob diferentes níveis de recurso e suas implicações para a expansão da praga**. Rio do Sul: Instituto Federal Catarinense, 2022. 2 p. Disponível em: <https://publicacoes.ifc.edu.br/index.php/fetec/article/view/4646>. Acesso em: 13 jan. 2024.

Egea, Mariana Buranelo; Marcionilio, Suzana Maria Loures de Oliveira. **A biodiversidade como fonte de compostos bioativos: moléculas e aplicações**. Rio Verde: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2021. 114 p. (1). Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/2341>. Acesso em: 12 maio 2023.

FARINHA, Sofia Paulos de Jesus Coroado. **Análise elementar de tumores e outras situações clínicas com base no método da fluorescência de raio-x**. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária, Departamento de Medicina Dentária, Instituto Universitário Egas Moniz, Caparica, 2020. Disponível em: <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/35378>. Acesso em: 13 jan. 2024.

Ferreira DE Andrade DE PAULA, S.; EMERENCIANO DAS CHAGAS, B. M.; ARAÚJO MENDONÇA, R. Utilização de microalgas para o tratamento de efluentes e produção de biocombustível: uma revisão. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, [S. l.], v. 12, n. 25, p. 64–93, 2023. DOI: 10.22292/mas. v12i25.1102. Disponível em: <https://revistasuninter.com/revistameioambiente/index.php/meioAmbiente/article/view/1102>. Acesso em: 5 jan. 2024.

Ferreira, I. M. L.; Batista, A. C. M. B.; ARAÚJO, A. M. M.; GONDIM, A. D. **Biomassa de microalgas como matéria prima para produção de biocombustíveis: uma visão geral**. IV Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. 2021, v. 4, n. 4, p. 1 – 15. Disponível em: <

https://www.editorarealize.com.br/editora/ebooks/conepetro/2021/TRABALHO_EV147_MD7_SA_ID183_05052021143648.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2022.

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

FONSECA, Juliana Azevedo. **Aplicação de algas na indústria alimentar e farmacêutica**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

França, Fábio Cristino. **Avaliação econômica de uma usina de biodiesel sob égide do programa RENOVABIO**: estudo de caso focado na substituição de óleo de sejo por sebo bovino. 2023. 149 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Energia do Instituto de Energia e Ambiente, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2023.

Frasca, Glaucia de Natali. **Estudo comparativo dos métodos de dessulfurização do biogás**. 2023. 89 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/18648>. Acesso em: 06 jan. 2024.

GALO, André Luiz; COLOMBO, Márcio Francisco. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000200036>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/ZY45c79NHd9vMzfgJWVXZHR/?format=html#>. Acesso em: 13 jan. 2024.

GRADÍSSIMO, Diana Gomes; MOURÃO, Murilo Moraes; Santos, Agenor Valadares. Importância do Monitoramento de Cianobactérias e Suas Toxinas em Águas Para Consumo Humano. **Revista Brasileira de Criminalística**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 15-21, 8 jul. 2020. Associação Brasileira de Criminalística - ABC. <http://dx.doi.org/10.15260/rbc.v9i2.276>.

Guedes, Jesyka Macêdo; Santos, Anne Gabriella Dias; Santos, Helcio Silva dos. Uso da biomassa como fonte energética para produção de biocombustíveis. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, [S.L.], p. 75-83, 31 ago. 2021. Universidade Estadual de Roraima. <http://dx.doi.org/10.24979/ambiente.v1i1.947>.

Guerra, Witter Duarte. **Avaliação do rendimento de biomassa e lipídeos empregando diferentes regimes de cultivo em *Scenedesmus* sp.** 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2019.

Guerra, Witter Duarte; Oliveira, Flávia Costa; Chiesa, Jaqueline Elise Garcia; Dias, Isabela de Souza; Vieira, Andressa Tironi; Borges, Wesley da Silva; Costa, Alexandre Sylvio Vieira da; FARIA, Anízio Marcio de; Batista, Antônio Carlos Ferreira. Avaliação do rendimento de biomassa e lipídeos empregando diferentes regimes de cultivo em *Scenedesmus* sp. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-11, 4 jan. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24565>.

Hakalin, N. L. S. **Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas), Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2014.

Kalinke, Cristiane. **Biochar quimicamente ativado: obtenção, caracterização e aplicação no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**. 2019. 218 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

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

KORU, E.; CIRIK, S. Biochemical Composition of *Spirulina* biomass in open-air system. 1st. International Congress on the Chemistry of Natural **Products, Proceedings of ICNP**. Trabzon, Tukey, 2002.

Lehmann, J., & Joseph, S. (Eds.). (2015). **Biochar for environmental management: science, technology and implementation**. <https://doi.org/10.4324/9780203762264>.

Linhares, Sérgio; Gewandsznajder, Fernando; Pacca, Helena. **Biologia Hoje: os seres vivos**. 3º edição. Editora Ática. São Paulo. 2016.

Liu, Z., & Zhang, F. S. (2009). Removal of lead from water using biochars prepared from hydrothermal liquefaction of biomass. **Journal of Hazardous Materials**, 167(1-3), 933-939. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.085>

LOPES, Andreia. **Otimização de processos de produção de biomassa, estabilização de extratos e formulação de produtos baseados em microalgas e cianobactérias com aplicações em agricultura**. 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2022.

Maciel, Gabrielly dos Santos. **Estudo da estabilidade oxidativa do biodiesel aditivado com aminas aromáticas**. 2018. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2018.

Magdouli, S., Brar, S.K., Blais, J.F. Co-culture for lipid production: advances and challenges. **Biomass and Bioenergy**, 2016, 92, 20-30. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.003).

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14(1), 217-232.

MATHIMANI, Thangavel; BALDINELLI, Arianna; RAJENDRAN, Karthik; PRABAKAR, Desika; MATHESWARAN, Manickam; VAN LEEUWEN, Richard Pieter; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: process evaluation and knowledge gaps. **Journal Of**

Cleaner Production, [S.L.], v. 208, p. 1-43, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.096>.

MIAO, Xiaoling; Wu, Qingyu. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 85-93, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.013>.

Mohan, D., Sarswat, A., Ok, Y. S., & Pittman Jr, C. U. (2014). Organic and inorganic contaminants removal from water with biochar, a renewable, low cost and sustainable adsorbent—a critical review. **Bioresource Technology**, 160, 191-202.

Moraes, Magna Suzana Alexandre. **14º Congresso acadêmico de iniciação em desenvolvimento tecnológico**, 14., 2021, Macéio. Resumos de trabalhos por Unidades Acadêmicas PIBIC e PIBITI: ciência, universidade e inovação. Macéio: Universidade Federal de Alagoas, 2021. 1544 p. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/jspui/handle/123456789/9761>. Acesso em: 10 out. 2023.

Neves, Dilaine Suellen Caires. **Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas aquosos bifásicos para determinação de metais em amostras de alimentos**. 2022. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Departamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2022.

Neves, Thais Juliane; Harder, Marcia Nalesso Costa. Diesel Verde: a nova era dos biocombustíveis em uma revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, Sl, v. 11, n. 2, p. 91-112, 01 dez. 2021. Disponível em: <http://fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/443/373816>. Acesso em: 15 jul. 2022.

Oliveira, A. C. DE. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus sp.* em efluente de bovinocultura biodigerido**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: Setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

Oliveira, Flávia Costa. **Otimização de produção de biomassa para extração lipídica utilizando estirpes da microalga *Scenedesmus sp.*** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Biocombustíveis, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2019.

Oliveira, Flávia Costa; Guerra, Witter Duarte; Chiesa, Jaqueline Elise Garcia; Dias, Isabela de Souza; Vieira, Andressa Tironi; Borges, Wesley da Silva; FARIA, Anizio Marcio de; Batista, Antônio Carlos Ferreira. Otimização de produção de biomassa para extração lipídica utilizando estirpes da microalga *Scenedesmus*. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-17, 2 jan. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24494>.

PACHECO, Katiellen Amorim. **Espectroscopia atômica**: uma breve revisão. 2022. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Química Industrial, Departamento de Química Industrial, Instituto Federal do Espírito Santo, Vila Velha, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ifes.edu.br/handle/123456789/2441>. Acesso em: 13 jan. 2024.

PARK, Jong-Hun; KIM, Do-Hyung; BAIK, Jong-Hyun; PARK, Jeong-Hoon; YOON, Jeong-Jun; LEE, Chae-Young; KIM, Sang-Hyoun. Improvement in H₂ production from *Clostridium butyricum* by co-culture with *Sporolactobacillus vineae*. **Fuel**, [S.L.], v. 285, p. 1-6, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119051>.

PEREIRA, Francisco Sávio Gomes. **Microrganismos: classificação e características**. Recife: IF, 2020. 36 p. (1). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339747666_Microorganisms_classification_and_characteristicsIn_Portuguese_Microrganismos_classificacao_e_caracteriticas. Acesso em: 23 out. 2022.

PEREIRA, Renato Crespo. **Ecologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2021. 1300 p. (1).

PÉREZ, Adriana. **Manejo del estereomicroscopio**. Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas. 2018.

PIAZZA, Bruno. **Avaliação da influência da irrigação ultrassônica passiva na remoção de debris dentinários**: avaliação em estereomicroscopia. 2013. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Centro Universitário Sagrado Coração, Bauru, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unisagrado.edu.br/jspui/handle/handle/588>. Acesso em: 13 jan. 2024.

PINTO, Luisa Fernanda Ríos. **Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus sp.* visando a produção de biodiesel**. 2014. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

Pina, Luís Celso Cardoso de; Lira, Evandro Bernado de; Costa, Maria Helena Juvito da; Pereira, Darlan Azevedo; Varandas, Roberta Conceição Ribeiro; Almeida, Patrícia de Moura; Nonato, Nyelson da Silva; Costa-Sassi, Cristiane Francisca. Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos / Evaluation of a microalgae cultivation system with a mix of tubular and parallel plate photobioreactors for microalgae biomass production in alternative culture media. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 37734-37777, 13 abr. 2021. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n4-304>.

PIRES, José C.M. COP21: the algae opportunity?. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 79, p. 867-877, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.197>.

PRIVADO, Debora Carolina Costa. **Efeitos dos biocidas dcoit e diclofluanida para as microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella minutissima* e *Dunaliella salina***. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Oceanografia, Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2021. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/3774>. Acesso em: 06 jan. 2024.

Prochnow, Fernando Duarte. **Biochar: uma revisão bibliográfica dos avanços científicos e industriais, das possibilidades no contexto brasileiro e do seu potencial para o desenvolvimento sustentável.** 2023. 103 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/252868>. Acesso em: 06 jan. 2024.

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

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

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. D. M.; MOURA, C. W. D. N. *Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) from two areas of the Marimbus Pantanal (Baiano and Remanso).* Hoehnea, v. 42, n. 3, p. 549-566, 2015.

RAMOS, Mariana Fernandes. **Técnicas espectroscópicas, cromatográficas e termogravimétricas com uso potencial no processo de rastreabilidade de *Cannabis sativa* L.** 2020. 119 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/233165/001128553.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13 jan. 2024.

RIOS, L. F.; KLEIN, B. C.; LUZ, L. F.; Maciel, F. R.; Maciel, M. W. **Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp.** Applied biochemistry and biotechnology, v. 175, n. 1, p. 469-476, 2015.

RODRIGUES, Lauana. **Aplicações da tecnologia de cultivo de microalgas verdes com vistas à biorremediação de efluentes e produção de bioativos.** 2022. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

RÓS, Patrícia Caroline Molgero da. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matérias-primas lipídicas para síntese de biodiesel pela rota etílica.** 2012. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

Rubio, Andrés López. **Fotografía de espécimes em el estereomicroscopio.** Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas. 2018.

RUSCHEL, Carla F. C.; FERRÃO, Marco F.; Santos, Francisco P. dos; SAMIOS, Dimitrios. Optimization of transesterification double step process (tdsp) to the production of biodiesel through doehlert experimental design. **Química Nova**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 267-272, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160018>.

SAFI, Carl; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre-Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 35, p. 265-278, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.

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

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

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

Santos, Clara. Virginia Marques; Ruzene, Denise Santos; Silva, Daniel Pereira, 9., 2017, São Cristóvão – SE. **Aspectos para implantação de uma biorrefinaria como alternativa para melhorar a matriz energética**. IX Simpósio de Engenharia de Produção de Sergipe (Simprod), 2017. 13 p. Disponível em: <https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/7602/2/BiorrefinariaMatrizEnergetica.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2022.

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

Schultz, Juliana. **Obtenção de carvão ativado a partir de resíduos agroindustriais para adsorção de antibiótico – Amoxicilina**. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Área de Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

SEVERO, Ihana Aguiar; FRANCISO, Erika; ZEPKA, Leila Queiroz; FRANCO, Telma Teixeira; JACOB-LOPES, E. **PRODUÇÃO DE BIODISEL DE 3ª GERAÇÃO A PARTIR DE CIANOBACTÉRIA PHORMIDIUM SP. EMPREGANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO**. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, [S.L.], p. 1-5, fev. 2015. Editora Edgard Blücher. <http://dx.doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-0336-25949-172298>.

Silva, Chrys Katielli Hoinacki da. **Biocarvão: um potencial suporte para imobilização de lacase e aplicação na biotransformação de acetaminofeno**. 2022. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022a.

Silva, Daniele de Fátima Amorim. **Transição energética e exploração de gás natural no Maranhão: possibilidades e limites a partir de 2013**. 2017. 148 f. Dissertação (Mestrado) -

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Socioeconômico, Departamento de Economia, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2017. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/1988>. Acesso em: 02 jan. 2024.

SILVA, Fernando Léo Bueno de Oliveira e. **Obtenção de Amônia a partir de rotas termoquímicas utilizando biomassa animal**: conversão, disponibilidade e modelagem do processo. 2023. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Energia, Instituto de Engenharia de Energia, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2023. Disponível em: <https://repositorio.unifei.edu.br/jspui/handle/123456789/3935>. Acesso em: 01 nov. 2023.

Silva, Gabriel Cortez da; Santos, Andressa Júlia Figueiredo dos; BREDDA, Eduardo Henrique; RÓS, Patrícia Caroline Molgero da. Otimização das condições de cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana* e caracterização do óleo obtido. **Brazilian Journal Of Development**, Curitiba, v. 6, n. 5, p. 4765-4773, 04 abr. 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n6-1672>

Silva, Jaqueline Carmo da. **Caracterização de microalgas e cianobactérias**: abordagens ecofisiológica e biotecnológica. 2022. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022b.

Silva, José Antônio; Nery, Aline Silva Dejesi. A classificação dos seres vivos nos livros didáticos de biologia do ensino médio: uma investigação à luz das novas contribuições da biologia molecular à taxonomia. **Cadernos da Educação Básica**. v. 5. p. 1 – 12. 2020. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/ad0f/bb408ca2ef93d2098987e6d45cce0d5f89f4.pdf> Acesso em: 05 jan. 2024.

Silva, José Yuri Gomes da. **Prospecção in silico de moléculas identificadas em extratos citotóxicos contra células tumorais de bactérias marinhas da Amazônia Azul**. 2022. 86 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022c.

Silva, Kaio Santana da; PASSOS, Gabriel Nascimento; Carvalho, Gabrielle de Oliveira; FIGUEIREDO, Ângela Vitória de Araújo; Silva, Mauro Gomes da. TIPOS DE COMBUSTÍVEIS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 1439-1454, 30 jun. 2022d. Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação. <http://dx.doi.org/10.51891/rease.v8i6.6075>.

Siqueira, Danilo Barbosa; Oliveira-Filho, Eduardo Cyrino. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas: Ciências da Saúde**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 109-128, 1 abr. 2008. Centro de Ensino Unificado de Brasília. <http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v3i1.549>. Disponível em: <https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/view/549/369>. Acesso em: 11 jan. 2024.

Sousa, Catarina V. **Microalgas: do tratamento de efluentes para a biorrefinaria**. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) - Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2014.

Souza, Wallace Rafael de. **Potencial de cianobactérias cultivadas em meio suplementado com vinhaça para produção de biodiesel**. 2018. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Tenório, Felipe Alexandre. **Cultivo de feijão comum sob aplicação de biocarvão do endocarpo do Ouricuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc): atributos químicos e biológicos do solo**. 2017. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2017. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/5929>. Acesso em: 02 nov. 2023.

TRENTN, Diego Moreto. **A geoeconomia dos investimentos chineses no Complexo Soja brasileiro sob a lente dos Regimes Alimentares**. 2023. 93 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Relações Internacionais, Departamento de Economia e Relações Internacionais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/252522>. Acesso em: 06 dez. 2023.

TOULIABAH, H. E. et al. A Review of Microalgae-and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants. **MDPI**, v. 27, p. 1141, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8839941/>. Acesso em: 5 out. 2023.

VALDEZ, Nicolás Ignacio. **Caracterização da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*: uma abordagem fisiológica, bioquímica e metabólica**. 2022. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Biotecnologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

Vidal, Iana Chaiene de Araújo. **Estudo da potencialidade de produção de biocombustíveis entre as microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* cultivadas em águas residuárias**. 216 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

Vidigal, Igor Gomes. **Estudo da estabilidade oxidativa do biodiesel para a qualidade do biocombustível**. 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Instituto de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

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

VIEIRA, Flavia de Freitas. **Pastas cimentícias com biochar de bagaço da cana-de-açúcar: caracterização física e microestrutural**. 2021. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2021.

Vieira, Tamires de Queiroz. **Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella* sp. com potencial para produção de biocombustíveis**. 2013. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

Xu, Y., & Chen, B. (2013). Investigation of biochar pyrolysis and its potential applications. **Environmental Science & Technology**, 47(12), 6477-6486.

YU, Xinheng; CHEN, Lei; ZHANG, Weiwen. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 56, p. 1-10, 17 fev. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00056>.

Zhu, Liandong; LI, Shuangxi; HU, Tianyi; NUGROHO, Yohanes K.; YIN, Zhihong; HU, Dan; CHU, Ruoyu; MO, Fan; LIU, Chenchen; HILTUNEN, Erkki. Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono- and mix-cultured microalgae. **Energy Conversion And Management**, [S.L.], v. 201, p. 1-8, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112144>.