



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã CEP 38304-402, Ituiutaba/MG

**ISABELA DE SOUZA DIAS**

**OTIMIZAÇÃO DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIODIESEL *in situ*  
UTILIZANDO CEPA DA MICROALGA *Scenedesmus sp.***

**ITUIUTABA**

**2019**

**ISABELA DE SOUZA DIAS**

**OTIMIZAÇÃO DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIODIESEL *in situ*  
UTILIZANDO CEPA DA MICROALGA *Scenedesmus sp.***

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista

**ITUIUTABA**

**2019**

**ISABELA DE SOUZA DIAS**

**OTIMIZAÇÃO DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIODIESEL *in situ***

**UTILIZANDO CEPA DA MICROALGA *Scenedesmus sp.***

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

18/12/2019

**COMISSÃO AVALIADORA:**

---

Prof. Dr. Hugo de Souza Rodrigues

---

Prof. Dr. Lucas Matheus da Rocha

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira Batista (Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

À toda minha família, em especial aos meus pais Claudia Cristina Ribeiro de Souza Rezende e Euripedes Dias Junior, e aos meus irmãos Eliana Souza Dias e Eduardo de Souza Dias pelo apoio, força e carinho incondicional durante meus 4 anos de graduação. Sem eles, esse trabalho seria impossível.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Antônio Carlos Ferreira Batista (Flash), por toda orientação, lições dentro e fora do laboratório, conselhos, disponibilidade em ajudar sempre e pela oportunidade de participar do trabalho de mestrado da Flavia, Witter e Jaqueline, possibilitando a confecção deste trabalho.

A Andressa Tironi, pela disponibilidade em me ajudar sempre tanto no auxílio para realizar as análises, quanto para confecção do trabalho e para cessar minhas dúvidas. Pela motivação e pensamento sempre positivo transmitindo calma e segurança.

Aos amigos criados durante esse tempo de pesquisa, a Flávia Costa Oliveira, Witter Duarte Guerra e a Jaqueline Elise Garcia Chiesa, meu muito obrigada por transmitir o conhecimento de vocês sobre as microalgas e possibilitar meu auxílio no trabalho de mestrado de vocês.

À todos os professores do ICENP-UFU que fizeram a grande parte para a construção do meu conhecimento durante o período de graduação, pelos conselhos tanto acadêmico como pessoal.

Aos amigos que o curso de Química me proporcionou em especial a Mayara Martins, pelos momentos de estudo, paciência, auxílio de sempre e pela amizade que se formou. Aos amigos pelos momentos de pesquisa no CT-infra à Allanna, Renan e Mateus.

Ao meu namorado Danilo Antônio Rafael, pela paciência, motivação e apoio de sempre durante esses 4 anos de graduação.

A UFU- Campus do Pontal, em especial ao ICENP-UFU, ao CT-infra pela infraestrutura para realização do projeto de pesquisa.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Temos que ter persistência e, acima de tudo,  
confiança em nós mesmos”

- Marie Curie

## RESUMO

Na busca por novas fontes renováveis de energia, os biocombustíveis surgem como uma alternativa promissora comparado aos combustíveis fósseis, sendo, portanto, o biodiesel um dos biocombustíveis mais viáveis para redução da utilização do diesel. Sendo assim, a obtenção de biodiesel a partir de óleo de microalgas surgiu como uma das mais promissoras fontes, devido à sua alta taxa de crescimento, possuir altos rendimentos em lipídeos e não necessitar de grandes áreas para o cultivo, nem de terras aráveis. As microalgas, são microrganismos fotossintéticos que utilizam energia solar associada com água e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) para produzir biomassa, sendo a fotossíntese o processo primordial para transformar a energia solar em formas de energia disponível para toda vida orgânica no ambiente. Desta forma, o trabalho teve como objetivo estudar e otimizar o cultivo de microalgas da espécie *Scenedesmus sp.* com o intuito de aumentar o rendimento lipídico que a mesma apresenta visando a produção de biodiesel *in situ*. A partir dos resultados obtidos, pelo planejamento fatorial 2<sup>5-1</sup> para um maior rendimento de lipídeos utilizando o método de Folch para a extração lipídica, foi usado o fotobiorreator horizontal, com meio CHU, intensidade luminosa máxima, ou seja, 3 lâmpadas do tipo “luz do dia”, com o tempo de cultivo de 30 dias, presença do sistema de aeração, sem adição de vitaminas e controle da temperatura. Em relação a produção de ésteres (biodiesel), foi possível identificar a conversão do material orgânico em ésteres etílicos, sendo o ácido graxo precursor mais dominante, o C:18.

**Palavras-chave:** Otimização. Microalgas. Biodiesel *in situ*.

## ABSTRACT

In the search for new renewable sources of energy, biofuels appear as a promising alternative compared to fossil fuels, making biodiesel one of the most viable biofuels to reduce the use of diesel. Thus, obtaining biodiesel from microalgae oil emerged as one of the most promising sources, due to its high growth rate, high lipid yields and no large areas for cultivation or arable land. Microalgae are photosynthetic microorganisms that use solar energy associated with water and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) to produce biomass. Photosynthesis is the primary process for transforming solar energy into forms of energy available for all organic life in the environment. Thus, the work aimed to study and optimize the cultivation of microalgae of the species *Scenedesmus* sp. in order to increase the lipid yield it presents aiming the production of biodiesel in situ. From the results obtained by the 2<sup>5</sup>-1 factorial design, for a higher lipid yield using the Folch method for lipid extraction, the horizontal photobioreactor was used, with CHU medium, maximum light intensity, i.e, 3 “type” lamps daylight, with the 30-day cultivation time, presence of the aeration system, no added vitamins and temperature control. Regarding the production of esters (biodiesel), it was possible to identify the conversion of organic material to ethyl esters, being the most dominant precursor fatty acid, C: 18

**Keywords:** Optimization Microalgae. Biodiesel in situ.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução do uso do Biodiesel no Brasil. ....	15
Figura 2: Mecanismo da reação de transesterificação em fase homogênea .....	16
Figura 3: Mecanismo da reação de transesterificação utilizando um catalisador ácido. .....	17
Figura 4: Panorama das aplicações de produtos produzidos a partir das microalgas... ..	19
Figura 5: Vantagens e propriedades do uso das microalgas .....	23
Figura 6: Estrutura química da clorofila <i>a</i> .....	23
Figura 7: Microalga do gênero <i>Scenedesmus</i> .....	24
Figura 8: Sistemas abertos de cultivo de microalgas. (a) Produção de microalgas em lagoas abertas na Austrália; (b) Sistemas raceways; (c) Lagoa circular.....	25
Figura 9: Sistema de fotobiorreatores fechados.....	26
Figura 10: Representação de uma curva de crescimento de microalgas em relação ao tempo de cultivo em regime batelada. ....	28
Figura 11: Esquema do procedimento experimental de cultivo .....	32
Figura 12: Extração de óleo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	37
Figura 13: Curva de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em 15 dias de cultivo. Fotobiorreator 1. ....	42
Figura 14: Curva de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em 30 dias de cultivo. Fotobiorreator 10. ....	43
Figura 15: Fotobiorreator horizontal sem presença de aeração (a) e fotobiorreator vertical com presença de aeração (b).....	44
Figura 16: Gráfico normal de efeitos para a produção de lipídeos em cultivo de microalgas. 1 = meio de cultivo; 2 = luminosidade; 3 = tipo de foto biorreator; 4 = tempo de cultivo; 5 = aeração. ....	50
Figura 17: Espectro obtido na região do infravermelho para o biodiesel <i>in situ</i> produzido. ....	51
Figura 18: Cromatograma dos ésteres etílicos do biodiesel <i>in situ</i> de microalgas. Condições de análise: Temperatura inicial 70°C por 3 minutos, incremento de 10°C/min até 200°C por 5 minutos, (* indica impurezas). Modo: Splitless, temperatura do injetor: 240°C, coluna Rtx-Wax de 0,30 m x 0,25 mm.....	52
Figura 19: Estruturas química dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico.....	53
Figura 20: Curva TGA do biodiesel <i>in situ</i> de microalgas. ....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor de lipídeos encontrado em diferentes espécies da microalga <i>Scenedesmus</i> . .....	20
Tabela 2: Principais vantagens e desvantagens das microalgas como fonte para o biocombustível. ....	21
Tabela 3: Potencial de fontes lipídicas na produção de biodiesel.....	22
Tabela 4: Variáveis e níveis estudados no crescimento da microalga ( <i>Scenedesmus sp.</i> ) .....	33
Tabela 5: Composição do meio Guillard modificado .....	34
Tabela 6: Composição do meio CHU. ....	35
Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}$ .....	39
Tabela 8: Valores obtidos experimentalmente para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca para <i>Scenedesmus sp.</i> .....	45
Tabela 9: Porcentagem de lipídeos de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> -1. Matriz de planejamento: Meio de cultivo (M); Luminosidade (L); Tipos de fotobiorreatores (R); Tempo de cultivo (T) e Presença de aeração (A). ....	47
Tabela 10: Efeitos das variáveis estudadas e suas interações na porcentagem de lipídeos. .....	49
Tabela 11: Relação dos ésteres encontrados e porcentagens relativas de cada um .....	52
Tabela 12: Temperaturas de ebulição dos ésteres encontrados. ....	54

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Biodiesel .....	14
1.2	Obtenção do biodiesel.....	15
1.3	Biodiesel a partir de microalgas.....	18
2.	Microalgas .....	23
1.4	Sistemas de cultivo .....	24
1.5	Fatores que afetam o crescimento e produção de lipídeos das microalgas.....	26
1.6	Nutrientes necessários para as microalgas .....	27
1.7	Fase de crescimento das microalgas .....	28
3.	OBJETIVOS.....	30
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	31
4.1	Obtenção da Microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	31
4.2	Condições de produção para cultivo da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	31
4.3	Meio de cultivo Guillard para <i>Scenedesmus sp.</i> .....	33
4.4	Meio de cultivo CHU para <i>Scenedesmus sp.</i> .....	34
4.5	Avaliação dos cultivos .....	35
4.6	Sistemas de aeração no cultivo de microalgas.....	36
5.	Métodos analíticos.....	36
5.1	Avaliação do crescimento de biomassa através do método de espectroscopia 36	
5.2	Determinação da quantidade de biomassa seca .....	37
5.3	Determinação do teor lipídeos .....	37
6.	Produção de ésteres utilizando a reação <i>in situ</i> .....	40
6.1	Análise Cromatográfica .....	40
6.2	Espectroscopia na região do infravermelho.....	41

6.3	Análise termogravimétrica.....	41
7.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
7.1	Obtenção de biomassa a partir do crescimento celular.....	41
7.2	Desempenho da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo.....	44
7.3	Espectroscopia na região do infravermelho.....	51
7.4	Análise Cromatográfica.....	52
7.5	Análise Termogravimétrica.....	53
8.	CONCLUSÕES.....	55
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda mundial por combustíveis, os constantes aumentos do preço do petróleo, pela grande possibilidade do esgotamento dos combustíveis fósseis e a preocupação atual pela redução de emissões de poluentes atmosféricos oriundo da queima desses combustíveis, têm estimulado o mercado mundial a buscar por fontes renováveis para a produção de biocombustíveis (RÍOS PINTO, 2014).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2019), os biocombustíveis são substâncias derivadas de biomassa renovável, tais como o biodiesel e o etanol. Um biocombustível pode substituir parcial ou integralmente, combustíveis de origem fóssil utilizado em motores ou em outros tipos de geração de energia, por serem biodegradáveis e praticamente livres de enxofre e compostos aromáticos que não causam impactos elevados ao meio ambiente. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil hoje são o etanol e o biodiesel, sendo que o biodiesel pode, apenas, ser encontrado em postos misturados ao diesel, atualmente na proporção de 11%.

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, ou conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (ANP, 2019).

O biodiesel pode ser produzido a partir de muitas matérias-primas, incluindo óleos vegetais como soja, babaçu, girassol, entre outras. Também pode-se utilizar gorduras animais e óleos usados em frituras.

Dessa forma, a busca por novas fontes renováveis para a produção de biocombustíveis vem se desenvolvendo muito. Sendo assim, a obtenção de biodiesel a partir de microalgas surgiu como uma fonte promissora, devido à sua alta taxa de crescimento, possuir altos rendimentos em lipídeos e não necessitar de grandes áreas para o cultivo, nem de terras aráveis (PENA et al., 2017).

As microalgas são microrganismos fotossintéticos que utilizam energia solar associada com água, micronutrientes e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) para produzir biomassa, sendo a fotossíntese o processo primordial para transformar a energia solar em formas de energia disponível para

toda vida orgânica no ambiente. Sendo assim, as microalgas vêm sendo consideradas como fonte de grande potencial para a produção de biodiesel, pois sua produtividade supera a de qualquer vegetal comercialmente produzido no mundo, sendo os rendimentos em óleo por hectare equivalente de área utilizada de ordens de grandeza superiores às das oleaginosas tradicionais (BAUMGÄRTNER, 2011; LOURENÇO, 2006).

### **1.1 Biodiesel**

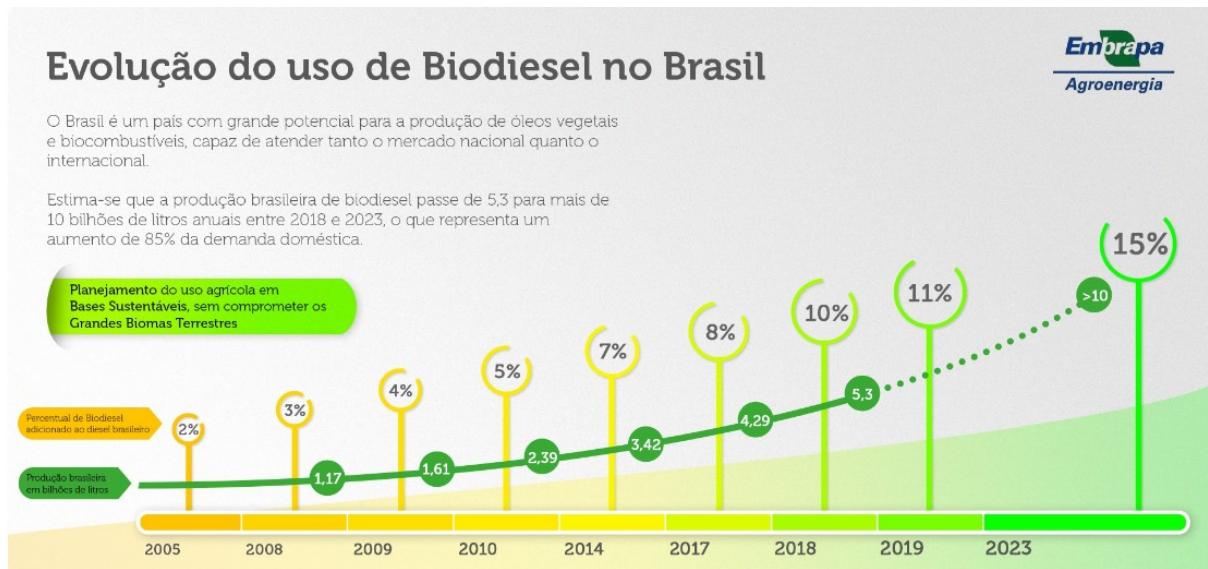
Por definição, biodiesel é um substituto natural do combustível diesel de petróleo, mas quimicamente o biodiesel é composto de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, com comprimento, geralmente de 8 a 18 átomos de carbonos saturados ou monoinsaturados, obtidos pela transesterificação de quaisquer triglicerídeos com álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) em presença de uma base forte como catalisador (KOH ou NaOH) ou por um ácido forte como catalisador (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (BORGES, 2014).

Os primeiros estudos, que levaram ao cenário atual do uso de biodiesel, tiveram início em 2003 com a criação da Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (CEIB) e do Grupo Gestor (GG), pelo governo federal. Em seguida, em dezembro de 2004 lançando o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), com o intuito de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira (ANP, 2019).

No mesmo ano, iniciou-se a comercialização voluntária de B2, ou seja, um teor de 2% do biodiesel ao diesel fóssil, de caráter facultativo. Em janeiro de 2008, tornou-se obrigatória a mistura B2 com o diesel em todo território nacional (ANP, 2019).

Com o amadurecimento do mercado, esse percentual foi aumentando e gradativamente ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), até o atual percentual de 11%, conforme pode ser observado pela Figura 1.

Figura 1: Evolução do uso do Biodiesel no Brasil.



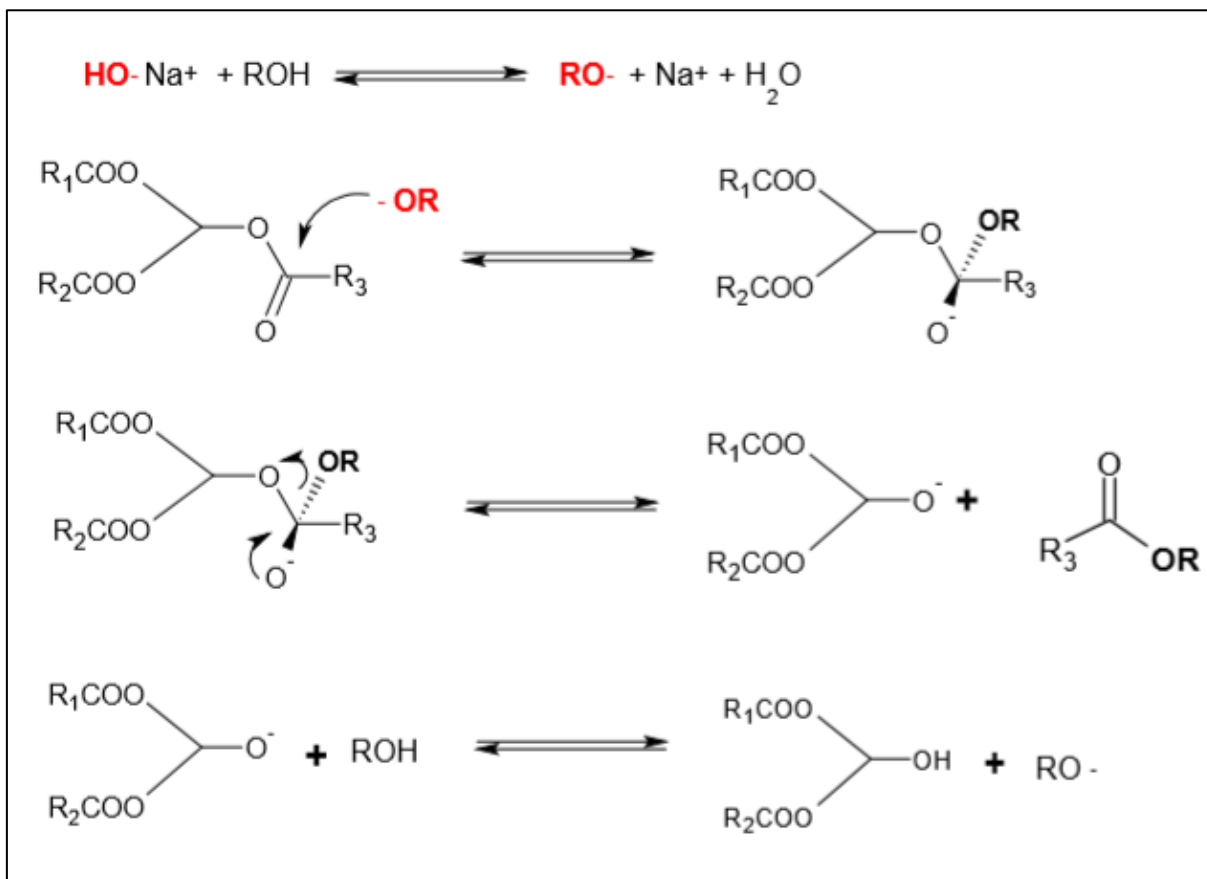
Fonte: Embrapa Agroenergia, 2019.

## 1.2 Obtenção do biodiesel

O biodiesel pode ser produzido a partir da reação de transesterificação, esterificação ou catálise enzimática.

A reação de transesterificação em meio alcalino, em fase homogênea é o processo mais utilizado pela indústria brasileira na produção de biodiesel, na qual é usada uma base forte como catalisador é um álcool de cadeia curta, pois apresenta uma maior cinética de reação. A Figura 2, apresenta o mecanismo para a reação de transesterificação em fase homogênea.

Figura 2: Mecanismo da reação de transesterificação em fase homogênea



Fonte: Próprio autor.

O primeiro passo é a produção do alcóxido entre uma base de Bronsted – Lowry (toda espécie química que recebe prótons), como os hidróxidos de metais alcalinos e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), formando água como subproduto.

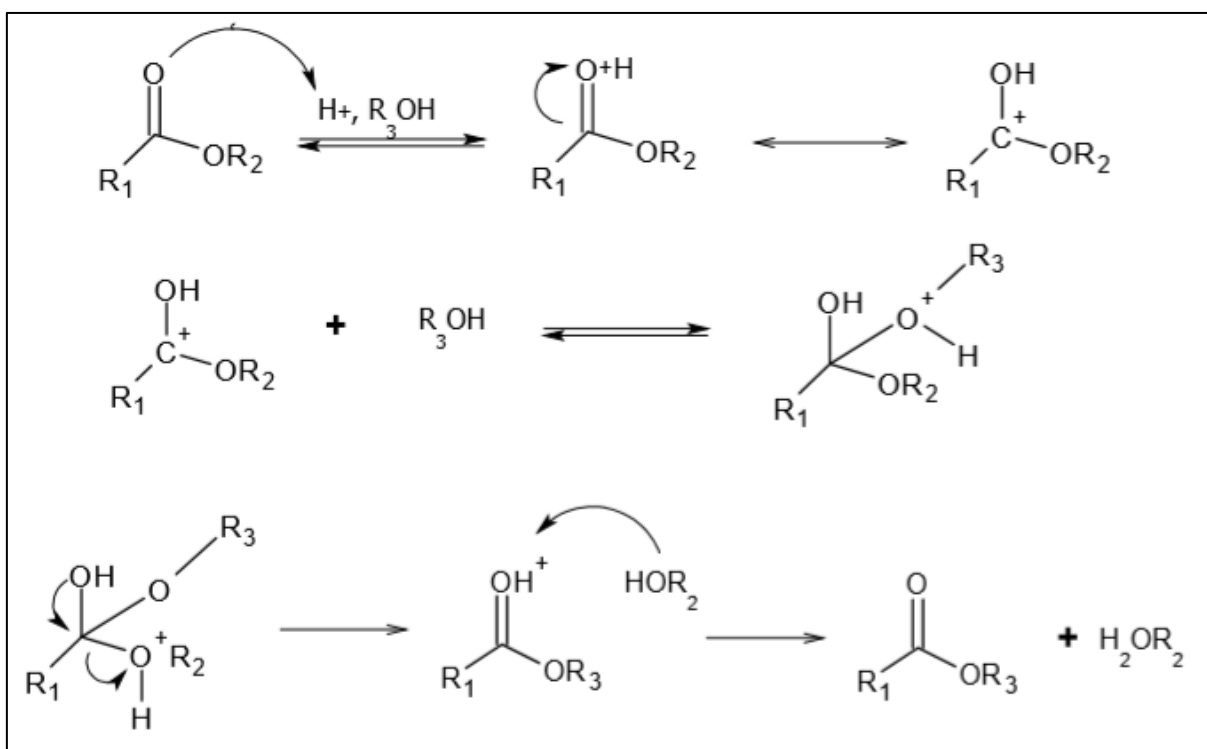
Como apresentado na Figura 2, quando adicionado ao triéster, o alcóxido atua como nucleófilo, sendo assim efetua um ataque nucleofílico à carbonila do triglicerídeo (eletrófilo), formando um intermediário tetraédrico da qual se formam a base conjugada de um diglicerídeo e um éster. A base conjugada do diglicerídeo formado desprotona o álcool, formando o diglicerídeo e regenerando o catalisador (MENEGHETTI, S.; MENEGHETTI, M.; BRITO, Y. 2013).

Em sequência, a molécula de diglicerídeo, é atacada pelo nucleófilo (catalisador), dando origem a uma molécula de monoéster graxo e uma molécula monoglicerídeo. Esta reação prossegue até a produção de glicerina e ésteres (biodiesel) como produtos finais



A reação de transesterificação utilizando como catalisador um ácido de Bronsted – Lowry (toda espécie química que doa prótons), apresenta uma menor cinética de reação em comparação com a catálise alcalina, a temperatura do meio de reação é próxima a temperatura de ebulição do álcool utilizado e também requer mais tempo de reação. A Figura 3, apresenta um esquema da reação de transesterificação por catálise ácida (MENEGHETTI, S.; MENEGHETTI, M.; BRITO, Y. 2013).

Figura 3: Mecanismo da reação de transesterificação utilizando um catalisador ácido.



Fonte: Próprio autor.

O ácido de Bronsted – Lowry, atua como nucleófilo e o triglicerídeo como eletrófilo. A carbonila do triglicerídeo captura um próton  $H^+$ , formando um carbocátion. Em seguida, este carbocátion sofre um ataque nucleofílico da molécula de álcool, formando um intermediário tetraédrico, que forma um diglicerídeo e um éster graxo regenerando o catalisador ( $H^+$ ). Por processos semelhantes serão formados como produtos finais a glicerina e ésteres (MENEGHETTI, S.; MENEGHETTI, M.; BRITO, Y. 2013).

### **1.3 Biodiesel a partir de microalgas**

O Brasil é um país muito rico em biodiversidades, tendo, portanto, muitas opções para a produção de biodiesel, tais como óleo de palma, babaçu, soja, girassol, entre outros (BAUMGÄRTNER, 2011).

As microalgas, são organismos fotossintetizantes, que apresentam um processo muito eficaz de conversão da energia luminosa em energia química e por isso tem chamado muito a atenção de vários centros de pesquisas, para sua utilização como matéria prima para a produção de biodiesel (BAUMGÄRTNER, 2011).

Os produtos produzidos a partir das algas, são utilizados em cosméticos, higiene pessoal, nutrição animal, suplementos proteicos para a alimentação humana e aquicultura (Embrapa Agroenergia, 2016).

A Figura 4 apresenta um panorama das aplicações de produtos produzidos a partir das microalgas.

Figura 4: Panorama das aplicações de produtos produzidos a partir das microalgas.



Fonte: Embrapa Agroenergia, 2016

As células das microalgas são ricas com alto teor de lipídeos em ácidos graxos, que apresentam características físico-químicas análogas ao óleo produzido por outros vegetais por isso são propícias para a produção de biodiesel. A composição da biomassa de microalgas é constituída de glicerol, açúcares e triglicerídeos de cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas. (COUGO, 2017).

Cada espécie de microalga apresenta diferentes porcentagem de teores lipídicos no interior de suas células, dependendo das condições de cultivo. A cepa da microalga *Scenedesmus sp.* utilizada no presente trabalho, apresenta de 21,1 a 43 % de lipídeos em suas células, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Teor de lipídeos encontrado em diferentes espécies da microalga *Scenedesmus*.

MICROALGA	LIPÍDEOS %
<i>Scenedesmus Obliquus</i>	12 - 14
<i>Scenedesmus Quadricauda</i>	1,9 – 18,4
<i>Scenedesmus sp.</i>	21,1 – 43
<i>Scenedesmus sp. dm</i>	21,1
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16 – 40
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	12
<i>Scenedesmus rubescens</i>	73

Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, 2014.

O biodiesel a partir de microalgas apresenta atributos favoráveis e promissores, de tal maneira que podemos destacar como vantagens a não competição com a agricultura, condições de adaptações variáveis, produção contínua e crescimento rápido, competentes fixadoras de carbono atmosférico, colaborando na diminuição de gases do efeito estufa (PENA *et al.*, 2017).

A Tabela 2, apresenta algumas das principais vantagens e desvantagens perante a produção de biodiesel a partir de microalgas.

Tabela 2: Principais vantagens e desvantagens das microalgas como fonte para o biocombustível.

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

Fonte: Adaptado de Fontoura, 2017.

Para demonstrar o potencial energético das microalgas, CHISTI (2007), apresenta um estudo que projeta a produção de lipídeos a partir de microalgas em relação a outras oleaginosas, sendo avaliado os rendimentos teóricos e a área necessária para produção, considerando 50% da demanda de biodiesel nos Estados Unidos (GRIS, 2011). A Tabela 3, apresenta este estudo.

Tabela 3: Potencial de fontes lipídicas na produção de biodiesel

<b>Cultura</b>	<b>Rendimento em óleo (L/ha)</b>	<b>Área necessária (M/ ha)<sup>a</sup></b>	<b>Percentual necessário da área de cultivo existente no EUA</b>
<b>Milho</b>	172	1.540	846
<b>Soja</b>	446	594	326
<b>Canola</b>	1.190	223	122
<b>Jatropha</b>	1.892	140	77
<b>Coco</b>	2.689	99	54
<b>Palma</b>	5.950	45	24
<b>Microalga<sup>b</sup></b>	136.900	2	1,1
<b>Microalga<sup>c</sup></b>	68.700	4.5	2,5

<sup>a</sup> para atender 50% da demanda por biodiesel nos EUA.

<sup>b</sup> 70% de óleo em peso seco

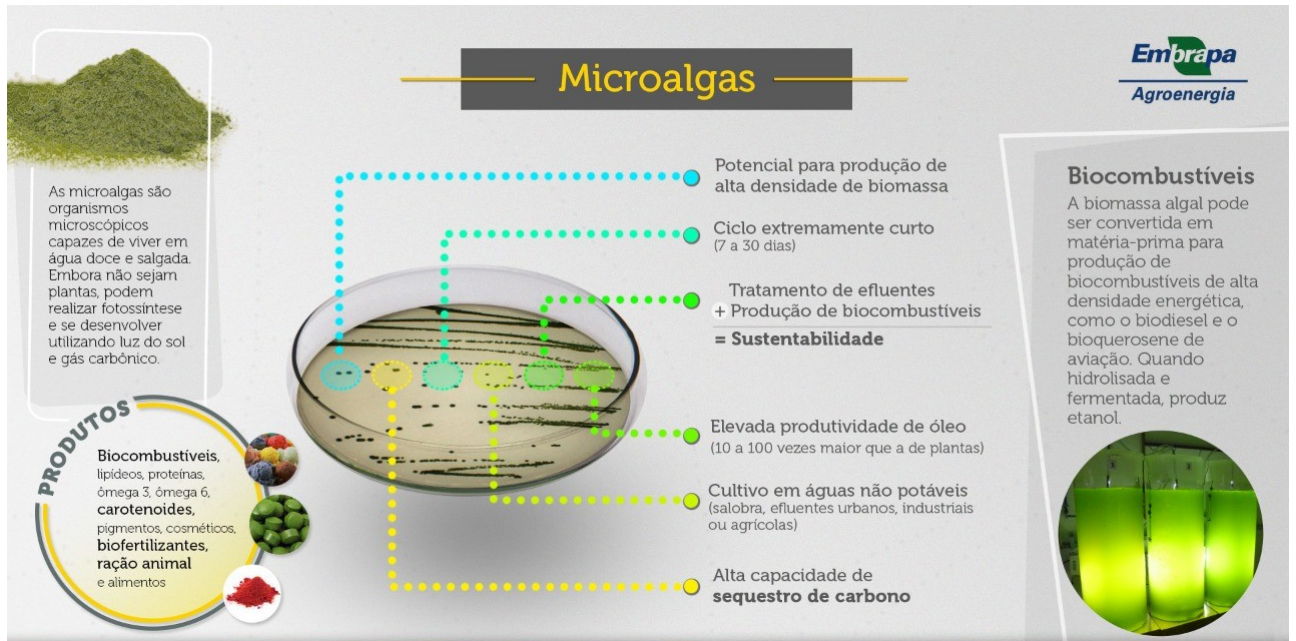
<sup>c</sup> 30% de óleo em peso seco

Fonte: Chisti, 2007

Pode-se notar que os rendimentos teóricos de uma alga com 30% de lipídeos em peso seco chegam a ser 130 vezes superiores ao rendimento da soja, por exemplo, com base em dados experimentais de produção em fotobiorreatores tubulares. (GRIS, 2011).

Portanto, por mais que a microalga apresente uma porcentagem lipídica inferior às demais matérias primas, seu rendimento de óleo pode atingir um valor muito significativo diante da alta produtividade, a Figura 5, apresenta de forma dinâmica algumas propriedades, seguida de vantagens e produtos obtidos a partir de microalgas.

Figura 5: Vantagens e propriedades do uso das microalgas

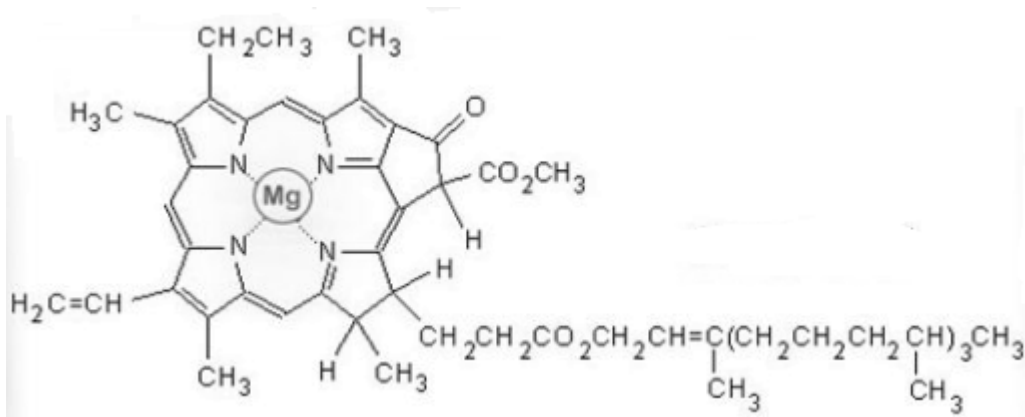


Fonte: Embrapa Agroenergia, 2019.

## 2. Microalgas

O termo microalga, sinônimo de fitoplâncton, engloba microrganismos procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos (algas de dimensões microscópicas) fotossintéticos dotados de clorofila *a*, a estrutura química da clorofila *a* está apresentada na Figura 6. Que podem crescer rapidamente e viver em condições de estresse devido à sua estrutura unicelular (GRIS, 2011; LOURENÇO, 2006).

Figura 6: Estrutura química da clorofila *a*



Fonte: Streit, 2005.

A principal via de produção de alimento pelas microalgas é a fotossíntese, que nada mais é que a síntese dos metabólitos essenciais a partir de substâncias químicas (CO<sub>2</sub>) e de energia luminosa (BICUDO, 2005).

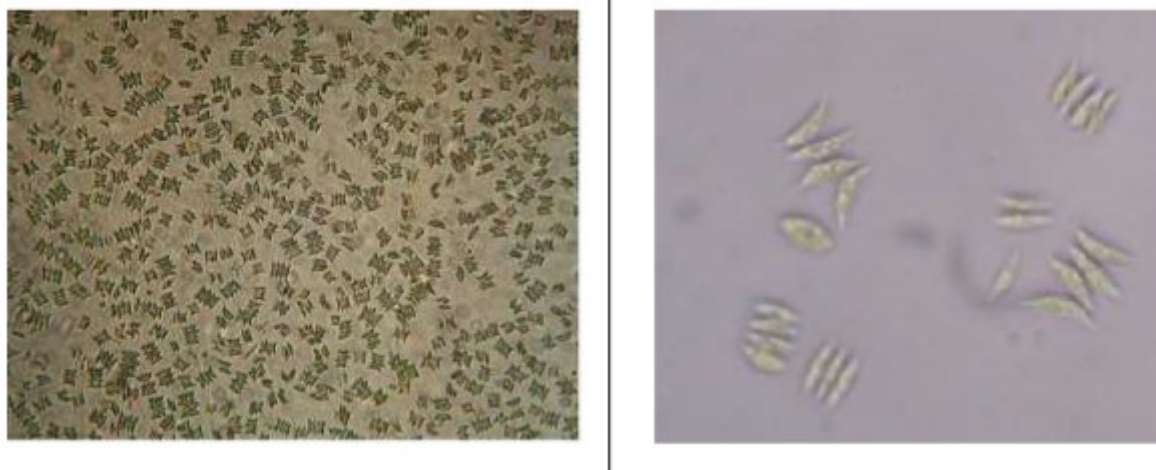
As microalgas são os únicos microrganismos que são capazes de converter luz solar, água e CO<sub>2</sub> em biomassa contendo alto teor de lipídeos, os quais são usados para a produção de biodiesel (LI et al., 2011).

- **Microalga *Scenedesmus***

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

São seres clorofilados, geralmente unicelulares, que se agrupam em colônias com propagação estritamente assexuada por auto esporulação, formadas em geral com 2, 4, 8 ou até 16 células, como apresenta a Figura 7 (COUGO, 2017).

Figura 7: Microalga do gênero *Scenedesmus*



Fonte: Baumgärtner, 2011.

#### **1.4 Sistemas de cultivo**

Os sistemas de cultivo de microalgas, são baseados de acordo com a demanda de produção e com a escolha da espécie a ser cultivada. Para tal, existem os sistemas do tipo lagoa abertas, obtendo uma maior quantidade de biomassa algal e os sistemas fechados, denominados de fotobiorreatores utilizado tanto para bancadas laboratoriais e em larga escala.



- **Sistemas abertos**

O sistema de cultivo aberto, apresenta diversas formas como por exemplo, lagoas abertas, tanques, *raceways* entre outros. Para tal sistema de cultivo, a baixa produtividade é predominante, mediante a falta de controle das variáveis ambientais. Contudo, entre as vantagens apresenta-se pelo baixo custo, facilidade de limpeza e a baixa demanda de energia.

Os mais utilizados são do tipo *raceways*, constituídos por canais de recirculação, conhecido como pistas com profundidade de 0,3 m. A recirculação e a agitação são causadas pela ação de pás fixas no início de cada lagoa. A Figura 8, apresenta os diferentes tipos de sistema aberto.

Figura 8: Sistemas abertos de cultivo de microalgas. (a) Produção de microalgas em lagoas abertas na Austrália; (b) Sistemas *raceways*; (c) Lagoa circular.



(a)



(b)



(c) Fonte: Gris, 2011; Chisti, 2007.

- **Sistemas fechados**

Os sistemas de cultivo fechado são denominados fotobiorreatores e classificados como planos, tubulares, horizontais, inclinados e verticais ou espirais. Apesar do custo elevado, os mesmos apresentam inúmeras vantagens, sendo a mais dominante o controle das variáveis.

Dentro deste controle das variáveis, podemos citar a diminuição na contaminação por microrganismos, evaporação moderada, maior reprodutibilidade, o controle de temperatura, nutrientes e iluminação, viabilizando um maior rendimento de biomassa (ESPINOSA et al., 2014). A Figura 9, apresenta um sistema de fotobiorreatores fechados.

Figura 9: Sistema de fotobiorreatores fechados



Fonte: Greenwell et.al., 2010.

### **1.5 Fatores que afetam o crescimento e produção de lipídeos das microalgas**

Para que as condições de crescimento e produção sejam ótimas, é imprescindível que ocorram adequações e/ou controle entre os fatores físicos, químicos e biológicos, como por exemplo a temperatura, iluminação, pH, dias de cultivo, nutrientes, o meio de cultivo entre outros. Esses fatores influenciam diretamente no crescimento e produção das microalgas (FOUNTOURA, 2017).

- **Temperatura**

A temperatura é uma das variáveis que mais afeta a taxa metabólica dos organismos, ela se refere também na velocidade de algumas reações química, como a fotossíntese e respiração

celular. Uma temperatura ótima para o crescimento de microalgas é em torno de (20 - 35) °C (OHSE et al., 2011).

- **Intensidade luminosa**

A disponibilidade de radiação solar está conectada diretamente com a produção de biomassa durante o cultivo fotossintético, na qual a mesma induz a potencial de lipídeos que está ligado a produção de triacilglicerídeos, associados a composição de biocombustíveis (ALMARALES ARCEO, 2012).

Em contrapartida, segundo o autor supracitado, o excesso de luminosidade causa a fotoinibição, ou seja, processo pelo qual pode-se afetar diretamente no crescimento celular até provocar efeitos letais para as microalgas.

Em cultivos laboratoriais, para uma ótima condição de crescimento das microalgas, utiliza-se iluminação artificial do tipo lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, que tenham um comprimento de onda de 350 a 700 nm, tendo como exposição luminosa de 12 horas luz e 12 horas escuro (BORGES, 2014).

- **Aeração e pH**

A agitação e/ou aeração promove uma homogeneização do meio de cultivo, evitando decantação da biomassa, equilibrando e permitindo a recepção de luz a toda matéria orgânica, assim como de nutrientes também (LOURENÇO, 2006; BORGES, 2014).

A microalga *Scenedesmus*, se adapta em condições de pH relativamente neutro a alcalino. Variações do pH do meio, podem interferir diretamente no metabolismo desses microrganismos, podendo induzir no rompimento da membrana celular (FRANCO et al., 2013).

## **1.6 Nutrientes necessários para as microalgas**

As microalgas, necessitam de nutrientes para seu crescimento. São conhecidos cerca de 30 elementos caracterizados como essenciais para sua composição química e crescimento.

Considerados universalmente de todas as algas, na composição química encontra-se carbono (C), nitrogênio (N), hidrogênio (H), oxigênio (O), fósforo (P), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn) e molibdênio (Mo), sendo que alguns elementos como enxofre (S), potássio

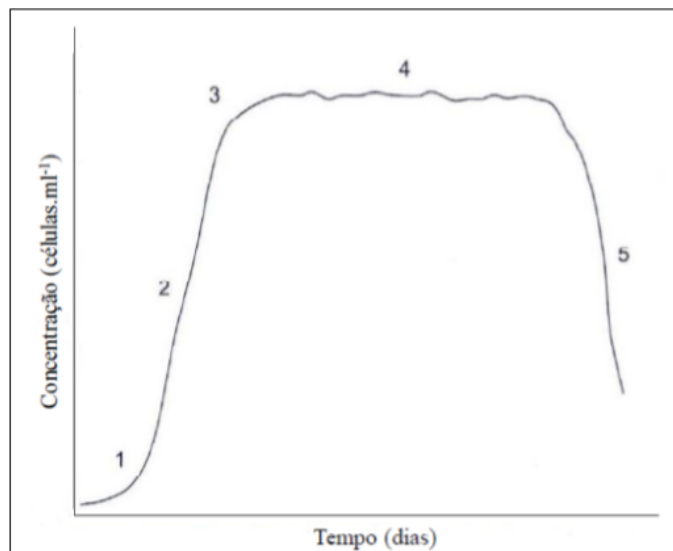
(K) e cálcio (Ca), possam ser substituídos quando necessários (LOURENÇO, 2006; BORGES, 2014).

A concentração dos nutrientes, presentes no meio de cultivo das microalgas, pode sofrer alterações, dependendo da necessidade exigida durante os processos metabólicos. Sendo assim, são divididas em duas categorias para o meio nutricional, os micronutrientes que participam da estrutura e da atividade de diversas enzimas, na qual, estão envolvidas nas vias metabólicas e os macronutrientes que são essenciais nos processos de troca de energia e fazem a regulação metabólica (BORGES, 2014).

### 1.7 Fase de crescimento das microalgas

Dos regimes de cultivos mais utilizados, o modo de operação por batelada destaca-se pela simplicidade, induzindo a minimização de contaminação no meio de cultivo entre outros. Porém, o desenvolvimento das microalgas pode sofrer alterações ao longo do seu processo de crescimento, mediante as mudanças de estresse e nutrientes, possibilitando a modificações na sua composição química e interferindo nas etapas de crescimento. A Figura 10, apresenta o comportamento do crescimento das microalgas.

Figura 10: Representação de uma curva de crescimento de microalgas em relação ao tempo de cultivo em regime batelada.



Fonte: (YUAN-KUN; HUI, 2004)

A fase de crescimento (1) *lag* é a fase de adaptação das células ao meio de cultivo, em seguida a fase exponencial (2) *log* é na qual, ocorre a multiplicação das células, um aumento

do crescimento, a fase (3) ocorre uma diminuição no crescimento, geralmente decorrente pelo declínio nutritivo do meio, fase (4) estacionária, equilíbrio na taxa de crescimento com alíquota de morte celular, e por fim a fase (5), declínio ou morte celular (YUAN-KUN; HUI, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi aprimorar as condições de cultivo de microalgas visando em um maior rendimento de lipídeos, trabalhando diretamente com as variáveis que afetam o crescimento celular das mesmas, em consequência visando a produção de ésteres pela reação de transesterificação *in situ* da biomassa da microalga em questão, *Scenedesmus sp.*

## **4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Obtenção da Microalga *Scenedesmus sp.***

A cepa da microalga *Scenedesmus sp.* utilizada neste trabalho foi doada pela Universidad Mayor de San Andreas, Bolívia ao Laboratório de Química do Instituto Luterano de Ensino Superior (ILES/ULBRA) e trazidas para o LERMAC (Laboratório de Energias Renováveis, Materiais e Catálise), no Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP-Química) - UFU- Universidade Federal de Uberlândia, onde foram estudadas.

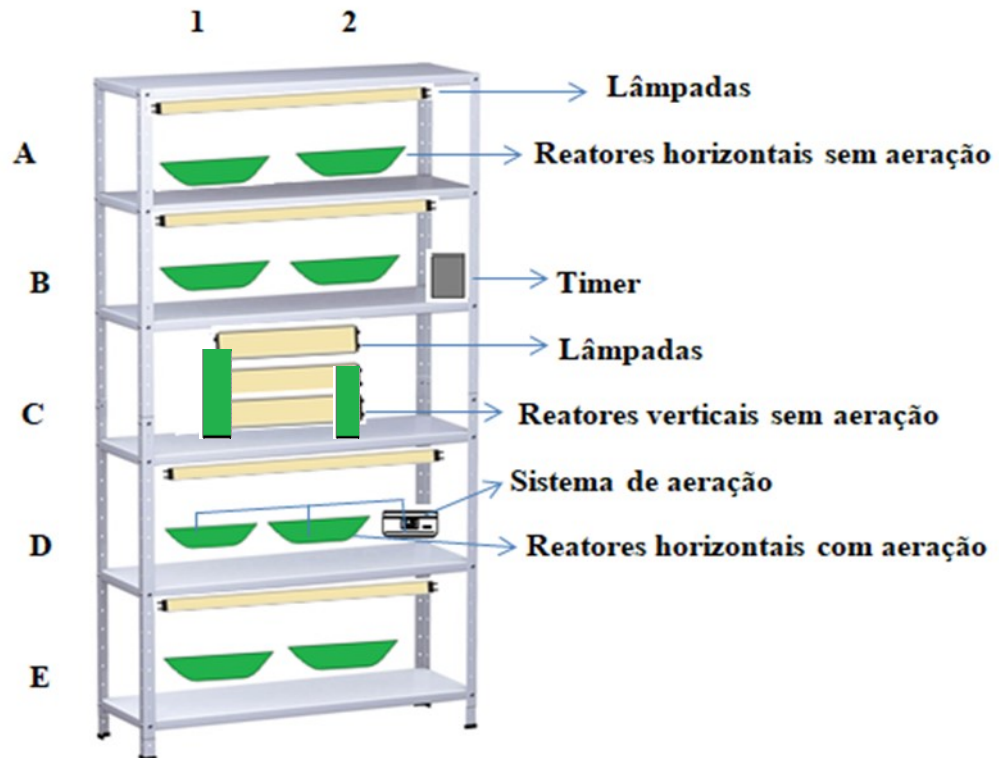
### **4.2 Condições de produção para cultivo da microlga *Scenedesmus sp.***

As condições operacionais realizadas em escala experimental laboratorial, ocorreram em cinco prateleiras distribuídas uniformemente e iluminadas.

As algas foram cultivadas em fotobiorreatores do tipo vertical e horizontal, com ajuste de tempo para exposição luminosa controlada através de um “timer”, o fotoperíodo foi de 12 h com luz artificial e 12 h ausência de luz artificial, ou seja, 12h: 12h claro/escuro. O aparelho utilizado foi um timer analógico (Exatron, modelo TMAOB).

Os fotobiorreatores horizontais estavam dispostos nas prateleiras A, B, D e E, na qual as lâmpadas se situavam na parte superior de cada um dos suportes. Os fotobiorreatores verticais, estavam dispostos na prateleira C. O esquema do procedimento experimental de cultivo está apresentado pela Figura 11.

Figura 11: Esquema do procedimento experimental de cultivo



Fonte: Próprio autor

A unidade experimental, contém um sistema de aeração com objetivo de fazer a agitação deixando o meio homogêneo. Contudo, seguindo o planejamento experimental adotado, nem todos os fotobiorreatores houve a necessidade do sistema de aeração.

Para avaliar a crescimento das microalgas em condições ótimas, foi necessário verificar as variáveis experimentais que mais afetam o crescimento das mesmas. Em seguida, estabelecer os níveis ótimos das variáveis.

As variáveis experimentais estudadas, foram definidas de acordo com o disposto na literatura, na qual foram realizadas comparações entre as mesmas que são descritos a seguir:

- Foi utilizado meio de cultivo Guillard (GUILLARD, 1975) ou meio CHU (SILVA, 2014)
- A unidade experimental era dotada de 3 ou 2 lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” em todas as prateleiras, de acordo com o modelo experimental com fotoperíodo de 12h: 12h luz/escuro.
- Os modelos de fotobiorreatores escolhidos, foram adotados de acordo com Borges



(2014), utilizando os fotobiorreatores horizontais do tipo bandeja (Prateleiras A, B, D e E) e fotobiorreatores verticais (Prateleira C) de acordo com a Figura 11.

- A quantidade de dias de cultivo foram 15 dias ou 30 dias.
- A aeração foi comparada com fotobiorreatores com aeração ou fotobiorreatores sem aeração.

Os fotobiorreatores eram cobertos com filme plástico de PVC e perfurados para diminuir a evaporação da água dos meios de cultivo. O volume total dos fotobiorreatores do tipo horizontal era de 1,5 L e dos fotobiorreatores verticais era de 2,5 L. Porém, foram utilizados apenas 1 L em ambos fotobiorreatores.

Foi empregado um planejamento fatorial fracionário, que é uma ferramenta estatística que possibilita a determinação das variáveis experimentais que afetam, de forma importante e significativa, o rendimento de lipídeos no crescimento das microalgas. A Tabela 4 apresenta as variáveis e os níveis estudados no planejamento fracionário.

Tabela 4: Variáveis e níveis estudados no crescimento da microalga (*Scenedesmus* sp.)

Variáveis	Níveis	
	(+)	(-)
Meio de cultivo	Guillard	CHU
Quantidades de lâmpadas	3	2
Tipos de reatores	Horizontal	Vertical
Quantidade de dias de cultivo	30 dias	15 dias
Aeração	Não	Sim

#### 4.3 Meio de cultivo Guillard para *Scenedesmus* sp

Para os primeiros testes realizados com a cepa da microalga do estudo em questão, utilizou-se o meio Guillard (GUILLARD,1975) modificado, pois nestes testes não havia adição de vitaminas e não havia correção de pH. A composição deste meio é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição do meio Guillard modificado

Reagentes	Componentes	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume do meio de cultivo (mL)
<b>Solução 1:</b> Sais Macronutrientes	Cloreto de Cálcio	36,76	4
	Sulfato de Magnésio	18,04	
	Bicarbonato de sódio	12,6	
	Hidrogenofosfato dipotássico trihidratado	11,41	
	Nitrato de Sódio	85,01	
<b>Solução 2:</b> Ferro e micronutrientes	Na <sub>2</sub> EDTA	4,36	4
	Cloreto de Ferro III	3,15	
	Sulfato de Cobre	0,012	
	Sulfato de Zinco	0,022	
	Cloreto de Cobalto	0,012	
	Cloreto de Manganês	0,18	
	Molibidato de Sódio	0,008	
	Água destilada		1000

Fonte: Adaptado de Borges, 2014.

Sendo assim, foram preparados o meio e a concentração do inóculo tanto para os fotobiorreatores horizontais quanto os verticais.

A proporção utilizada foi de: 80% de água destilada com 4 mL de cada solução e 20% de inóculo (cepa da microalga) (BORGES, 2014).

#### 4.4 Meio de cultivo CHU para *Scenedesmus* sp

Para os testes realizados com a cepa da microalga em questão, utilizou-se o meio CHU (SILVA, 2014) sem adição de vitaminas e não havia correção de pH, conforme a Tabela 6.

Tabela 6: Composição do meio CHU.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
Nitrato de sódio	0,25
Cloreto de cálcio di-hidratado	0,025
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,075
Fosfato de potássio dibásico	0,075
Fosfato de potássio monobásico	0,175
Cloreto de sódio	0,025
EDTA	0,05
Hidróxido de potássio	0,031
Sulfato ferroso hepta-hidratado	0,005
Ácido bórico	0,01142
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$8,82 \cdot 10^{-5}$
Cloreto de manganês tetra-hidratado	$1,44 \cdot 10^{-5}$
Molibdato de sódio di-hidratado	$7,1 \cdot 10^{-6}$
Sulfato de cobre penta-hidratado	$1,57 \cdot 10^{-5}$
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	$4,9 \cdot 10^{-6}$

Fonte: Silva, 2014.

Contudo, para a preparação do meio de cultivo com as microalgas com meio CHU, foi utilizado a mesma proporção como descrito para o meio Guillard, sendo adicionado 5 mL do meio preparado para 1 000 mL.

#### **4.5 Avaliação dos cultivos**

A resposta analisada neste estudo foi o rendimento de lipídeos e quantidade de biomassa seca da microalga após cada experimento.

Para comparar a produtividade de lipídeos e biomassa entre os diferentes meios de cultivo, a microalga em questão, foi submetida em regime de batelada, no qual, todos os experimentos foram preparados em ambiente laboratorial com controle de nutrientes, aeração e luminosidade, com intuito de diminuir os riscos de contaminação.

#### **4.6 Sistemas de aeração no cultivo de microalgas**

Segundo o planejamento de experimentos, nem todos os fotobiorreatores deveriam utilizar o sistema de aeração. Os fotobiorreatores pré-determinados para utilização de aeração, foram acoplados de tal maneira que o borbulhamento de ar fosse constante, ou seja, 24 horas durante todo o período de cultivo.

O sistema de aeração foi adotado com a finalidade de agitação, criando uma homogeneização do meio de crescimento, evitando decantação e acúmulo de células no fundo do fotobiorreator (LOURENÇO, 2006).

O aparelho utilizado (Big Air, modelo A420 110 V) tinha uma vazão de 4,5 L de ar por minuto, somando a oxigenação do sistema, lançando movimento pelo efeito de bolha de ar.

### **5. Métodos analíticos**

#### **5.1 Avaliação do crescimento de biomassa através do método de espectroscopia**

A fim de analisar o crescimento celular da biomassa, foi utilizado o método de espectrofotometria na região do visível, com as medidas de absorbância no comprimento de onda 570 nm. A qual, é amplamente empregada para os estudos envolvendo microrganismos, como as microalgas (LOURENÇO, 2006).

Este é o método mais utilizado para verificar o crescimento celular da biomassa de microalga, mediante os meios de cultivos abertos ou fechados. Para tal, foi utilizado o espectrofotômetro UV-vis (espectroscopia ultravioleta visível), da marca SHIMADZU modelo UV-1800.

Este procedimento, baseia-se na obstrução física da passagem da luz pelas células, em que quanto maior a concentração celular, maior será a absorbância. Segundo os princípios da Lei de Lambert-Beer, a intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente (HARRIS, 2005).

O monitoramento de crescimento das microalgas, foi efetuado de 5 em 5 dias, realizando as leituras de absorbância, nos dias 0, 5, 10, 15, 20..., para cada ensaio. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas, a fim de obter melhores resultados, sendo utilizado como branco o meio de cultivo sem a microalga.

## 5.2 Determinação da quantidade de biomassa seca

Decorrido os dias de cultivo determinados pelo modelo experimental, os volumes resultantes nos fotobiorreatores contendo as microalgas, foram submetidos a centrifuga da marca AAKER de 4000 rpm, a fim de que toda biomassa decantasse retirando em seguida, a água na fase superior.

Posteriormente, de acordo com o planejamento experimental, a biomassa foi colocada em um béquer previamente pesado, sendo submetido a secagem em uma estufa a 80°C por 48 horas. Passado o tempo, o béquer com a biomassa foi pesado novamente, para obter a quantidade de biomassa seca.

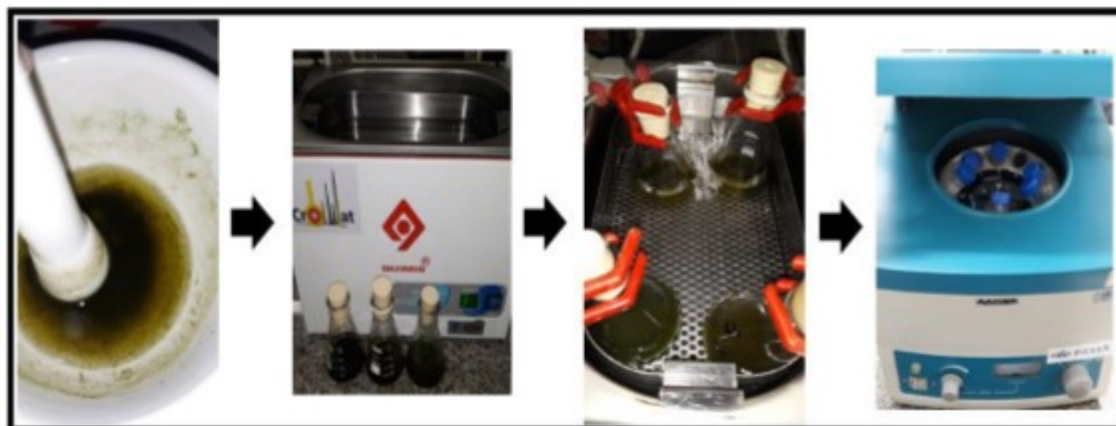
## 5.3 Determinação do teor lipídeos

O método utilizado para a determinação do teor de lipídeos da microalga, foi baseado no método de Folch, Lees, Stoane-Stanley (1956), na qual, apresentam um procedimento bastante eficaz em relação a determinação do teor lipídico.

Primeiramente, a biomassa seca obtida anteriormente de aproximadamente 1 g foi macerada em um cadinho de porcelana com pistilo, com 20 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol. Posteriormente, a mistura obtida com a biomassa foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL e levado ao banho ultrassônico do modelo QUIMIS a 40 kHz por 90 minutos, com a finalidade de romper as células das microalgas facilitando a extração do óleo.

Em seguida, a mistura foi submetida a centrifugação a 4800 rpm por 8 minutos, os passos citados acima, estão apresentados na Figura 12.

Figura 12: Extração de óleo da microalga *Scenedesmus* sp.



Fonte: Próprio autor

O sobrenadante foi retirado, colocando o mesmo em um funil de separação. Ao mesmo funil, adicionou-se 6 mL da solução de KCl 0,88%, realizando uma agitação, de tal maneira que, houvesse a formação de duas fases, uma fase inferior contendo os lipídeos e uma fase superior.

Em seguida, retirou-se a parte inferior com o material desejado e foi descartado a parte superior. Novamente, o material com lipídeos foi alocado ao funil de separação, adicionando 4 mL de uma mistura de metanol:água destilada na proporção 1:1 (v/v), passando novamente por uma agitação, formando duas fases.

A fase inferior contendo o teor lipídico foi retirada do funil de separação, sendo alocada em um béquer. Posteriormente, ao mesmo béquer foi adicionado MgSO<sub>4</sub> (Sulfato de Magnésio Anidro), com o intuito de retirar toda água que continha a mistura.

Em seguida, a mistura resultante foi filtrada, sendo colocada em um balão de fundo redondo previamente pesado. Posteriormente, foi levado ao rota evaporador para evaporar todo solvente da mistura, restando apenas o material em questão, ou seja, o teor lipídico e/ou óleo da microalga.

Para quantificar o teor de óleo final em porcentagem massa, foi necessário a utilização de uma equação, representada na Equação 1.

$$T_L = \frac{M_O \cdot 100}{M_B} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

T<sub>L</sub> = teor de lipídeos, expressa em porcentagem (%)

M<sub>O</sub> = massa de óleo produzida, expressa em gramas (g)

M<sub>B</sub> = massa de biomassa, presente em 1 L de meio de cultivo (g)

#### **5.4 Planejamento estatístico**

O planejamento fatorial fracionário foi definido como 2<sup>5-1</sup>. Sendo realizado 16 experimentos. A matriz de planejamento está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$

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

Os ensaios foram realizados aleatoriamente. O arranjo do segundo ensaio, por exemplo, ficou da seguinte forma:

- Meio de Cultivo: Guillard (+)
- Quantidade de lâmpadas: 2 (-)
- Tipo de foto biorreator: Vertical (-)
- Período de cultivo: 15 dias (-)
- Sistema de aeração: Não (+)

Obtendo dessa forma, 16 respostas diferentes para rendimento de biomassa, porcentagem de óleo e crescimento celular, sendo assim finalizando a primeira etapa dos ensaios.

## **6. Produção de ésteres utilizando a reação *in situ***

Para a produção de ésteres via transesterificação ácida *in situ*, o método utilizado foi baseado no procedimento proposto por Lewis et al. (2000), para a síntese de ésteres alquílicos, descritos a seguir.

Inicialmente, foi obtido 4,3327g de biomassa seca, a qual, foi alocada dentro de um balão de fundo redondo de 1000 mL provido de tampa. Ao tubo, adicionou-se 649,90 mL de uma solução contendo álcool (etanol), catalisador (HCl) e solvente (clorofórmio) na razão 10:1:1 (v/v/v). Realizou-se uma agitação manual, de tal maneira que a biomassa permanecesse suspensa na solução, colocando imediatamente em banho termostatizado a 60°C por 120 minutos.

Decorrido o tempo de reação, o balão foi retirado do banho e resfriado até temperatura ambiente, em banho com água gelada. Posteriormente a solução resultante foi alocada ao funil de separação sendo adicionado 30 mL de água desionizada, em seguida, adicionado 60 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio na proporção 4:1 (v/v), agitando-se manualmente.

Houve uma separação de fases, a qual o material orgânico, localizado na parte superior, foi recolhido sendo depositado em outro tubo. Este processo foi realizado em triplicata, para garantir uma completa remoção dos ésteres formados do meio reacional.

Sendo assim, o solvente foi, então, evaporado com o auxílio do aparelho evaporador rotativo. Os ésteres etílicos formados foram submetidos a análise CG-MS com adição de padrão interno, infravermelho e TGA.

### **6.1 Análise Cromatográfica**

A análise cromatográfica foi realizada em um Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas, da marca SHIMADZU (modelo GCMS-QP2010 SE), com a adição do padrão interno metil heptadecanoato solubilizado em n-heptano P.A.

As condições de análises foram:

- Temperatura inicial: 70°C por 3 min;



- Incremento de 10°C/min até 200°C, por 5 min;
- Modo: Splitless;
- Temperatura do injetor: 240°C ;
- Coluna (polar): Rtx-Wax de 30 m de comprimento e 0,25mm de diâmetro

## **6.2 Espectroscopia na região do infravermelho**

Foi realizado uma espectroscopia na região do infravermelho no intervalo de 500 a 4 500  $\text{cm}^{-1}$ , no aparelho Agilent Technologies, Modelo Cary 630 FTIR com cristal de ATR, em temperatura ambiente (32°C).

## **6.3 Análise termogravimétrica**

A estabilidade térmica da amostra de biodiesel *in situ* obtido, foi avaliada em um aparelho do modelo TGA55 da marca TA instruments.

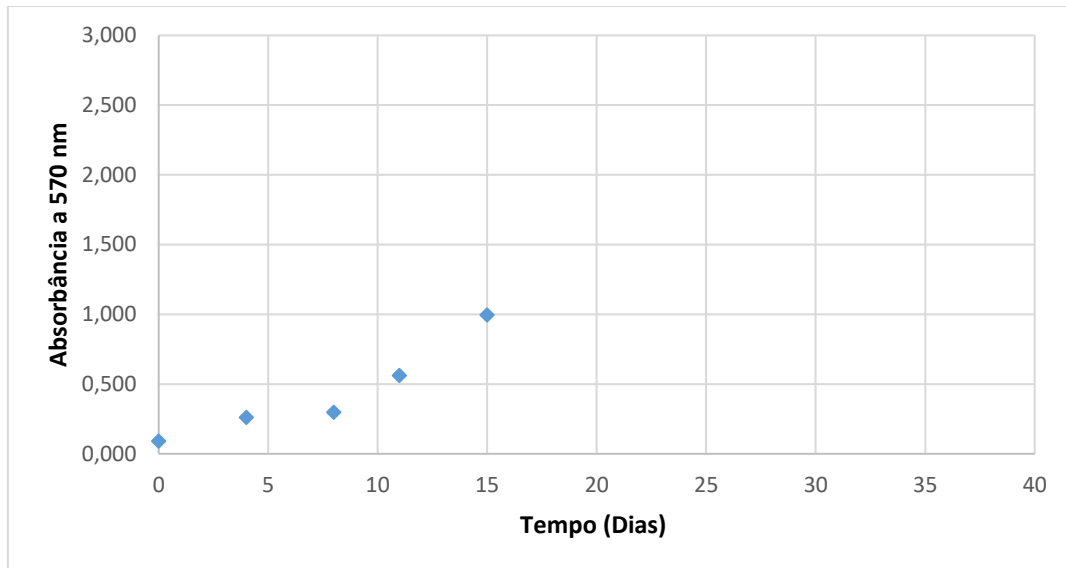
As amostras, com massa de aproximadamente 5 mg, foram colocadas em porta amostras de alumina e aquecidas de 30°C até 600°C, utilizando um gás inerte com fluxo de nitrogênio de 50  $\text{mL min}^{-1}$  e taxa de aquecimento de 10°C  $\text{min}^{-1}$ .

# **7. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## **7.1 Obtenção de biomassa a partir do crescimento celular**

Como a microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em diferentes regimes de cultivo, foi possível a partir da leitura das absorvâncias observar o crescimento celular da biomassa em função do tempo de cultivo. A Figura 13, mostra este efeito.

Figura 13: Curva de crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. em 15 dias de cultivo. Fotobiorreator 1.

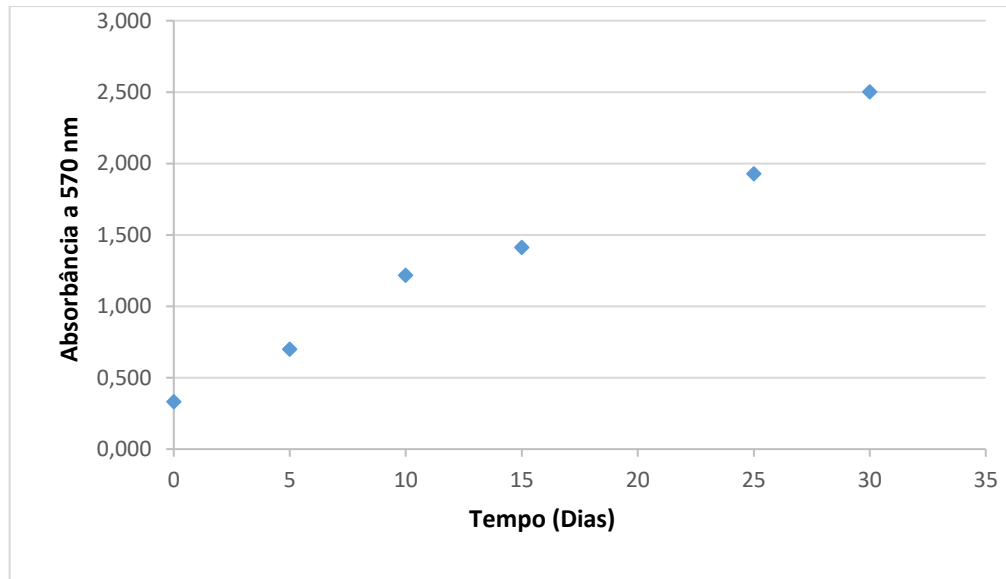


Podemos observar que, o crescimento celular se dá de forma exponencial, ou seja, apresenta um crescimento gradual no decorrer dos períodos de cultivo.

As microalgas apresentam curvas de crescimento bem definidas como: a fase de adaptação chamada *lag*, na qual se dá nos primeiros dias de cultivo devido ao período de adequação fisiológica das células diante do meio utilizado para o cultivo; uma fase exponencial, chamada de logarítmica, indica o início do crescimento e multiplicação das células, enquanto houver disponíveis nutrientes, luz e temperatura (YUAN-KUN; HUI, 2004).

A Figura 14, apresenta o crescimento celular da microalga em questão, em um período de 30 dias.

Figura 14: Curva de crescimento celular da microalga *Scenedesmus* sp. em 30 dias de cultivo. Fotobiorreator 10.



Podemos observar que, durante o período de 30 dias ainda havia crescimento celular da microalga, conforme previsto na literatura. Este período é caracterizado pela fase 3, ou seja, neste tempo a microalga começa a ter redução do crescimento celular.

Podemos concluir também desta análise de crescimento celular, que para realizar a leitura no espectrofotômetro, a solução deverá estar livre de partículas suspensas, pois com as mesmas haverá espalhamento de luz e não absorção. Sendo assim, a presença de aeração é um grande fator para que estas partículas estejam tão menores quanto possível, mais uniformes e/ou homogeneizadas, como apresenta a Figura 15.

Figura 15: Fotobiorreator horizontal sem presença de aeração (a) e fotobiorreator vertical com presença de aeração (b).



(a)

(b)

Fonte: Próprio autor

## **7.2 Desempenho da microalga *Scenedesmus* sp. em relação ao teor de lipídeos, biomassa e rendimento de óleo.**

Os resultados obtidos, que foram apresentados na Tabela 8 seguem de acordo com o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ , totalizando os 16 experimentos. Que tem como relação o teor de lipídeos, a quantidade de óleo adquirida e a biomassa seca dos fotobiorreatores verticais e horizontais.

Tabela 8: Valores obtidos experimentalmente para o teor de lipídeos, quantidade de óleo produzido e biomassa seca para *Scenedesmus sp.*

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

Com base nos resultados apresentados na Tabela 8, pode-se observar que os maiores valores para o rendimento do teor lipídico são com os fotobiorreatores que continham o sistema de aeração, sendo os ensaios (1,4,6,7,9,11,12,14 e 15) com os valores de 17,99%, 14,17%, 12,56%, 7,87%, 18,19%, 12,71%, 15,53%, 13,34% e 19,84%, respectivamente.

Porém, alguns fotobiorreatores que não continham o sistema de aeração apresentaram também ótimos resultados em rendimento lipídico, como o ensaio 5 (11,31%) e ensaio 2 (8,90%).

As variáveis estudadas foram: meio de cultivo, luminosidade, tipos de fotobiorreatores, tempo de cultivo e presença de aeração. Contudo, foi realizada a combinação em duplas das variáveis, em seguida as integrais como apresentada na Tabela 9, que traz a matriz do

planejamento de experimentos. As respostas para este experimento foram para porcentagem de lipídeos extraídos das células.

Tabela 9: Porcentagem de lipídeos de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>5-1</sup>. Matriz de planejamento: Meio de cultivo (M); Luminosidade (L); Tipos de fotobiorreatores (R); Tempo de cultivo (T) e Presença de aeração (A).

Ensaio	Variáveis																%
	M	L	R	T	A	MxL	MxR	MxT	MxA	LxR	LxT	LxA	RxT	RxA	TxA	MxLxRxTxA	
#1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	17,99
#2	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	8,90
#3	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	7,39
#4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	14,17
#5	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	11,31
#6	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	12,56
#7	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	7,87
#8	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	7,12
#9	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	18,19
#10	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	5,92
#11	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	12,71
#12	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	15,53
#13	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	6,20
#14	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	13,34
#15	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	19,84
#16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,30

Foram realizados os cálculos para todas as possibilidades de acordo com o planejamento fatorial  $2^{5-1}$ , apresentados na Tabela 9.

A partir dos resultados de porcentagem de lipídeos obtidos, os efeitos foram calculados segundo a diferenças entre as medias aritméticas (MA) de porcentagem de lipídeos em cada uma das variáveis, de acordo com a Equação 2.

$$Ef = R(+)-R(-) \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

- $Ef$  = efeito da variável
- $R(+)$  = porcentagem da MA de lipídeos no nível alto da variável
- $R(-)$  = porcentagem da MA de lipídeos no nível baixo da variável

A partir desta equação, foram calculados os efeitos das interações principais, entre dois fatores e entre todos os fatores, no qual estão apresentados na Tabela 10.



Tabela 10: Efeitos das variáveis estudadas e suas interações na porcentagem de lipídeos.

	<b>Variáveis</b>	<b>Efeitos</b>
1	Meio	-1,95
2	Luminosidade	-0,19
3	Reator	-1,78
4	Tempo	1,59
5	Aeração	-6,45
12	Meio x luminosidade	-3,06
13	Meio x reator	0,99
14	Meio x tempo	-1,51
15	Meio x aeração	0,11
23	Luminosidade x reator	0,11
24	Luminosidade x tempo	3,37
25	Luminosidade x aeração	0,99
34	Reator x tempo	0,61
35	Reator x aeração	1,29
45	Tempo x aeração	-1,99
12345	Meio x luminosidade x reator x tempo x aeração	-1,59

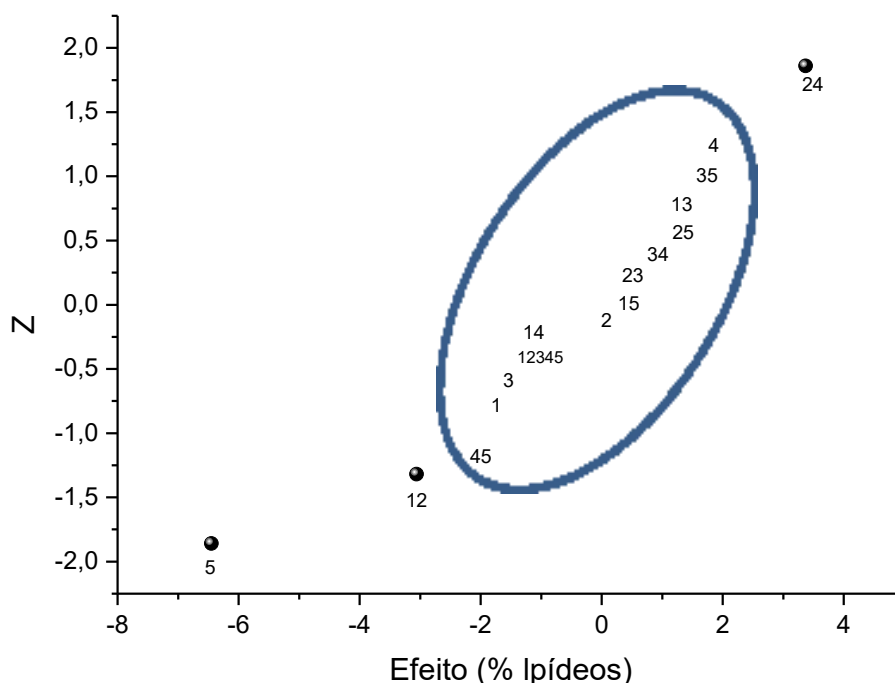
Podemos concluir que, a partir dos valores de efeitos obtidos, a presença de aeração (Efeito 5 = -6,45) no meio de cultivo, apresentou um maior rendimento na produção de lipídeos. Em sequência, outro efeito marcante foi o de luminosidade e tempo de cultivo (Efeito 24 = 3,37), e por último a interação meio e luminosidade (Efeito 12 = -3,06).

Para a construção do gráfico normal de efeitos, foram calculadas as interações entre os efeitos resultando em um total de 16 efeitos: os cinco principais, as interações de dois fatores e uma interação entre os cinco fatores, a partir da Equação 2.

Para realizar os cálculos de efeitos de interação entre as variáveis, multiplica-se os sinais dos níveis de cada elemento, realizando as interações pela multiplicação de duas em duas, depois de três em três variáveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Os valores de efeitos podem ser visualizados melhor no gráfico da Figura 16.

Figura 16: Gráfico normal de efeitos para a produção de lipídeos em cultivo de microalgas. 1 = meio de cultivo; 2 = luminosidade; 3 = tipo de foto biorreator; 4 = tempo de cultivo; 5 = aeração.



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

No gráfico da Figura 16, podemos observar que os pontos nas extremidades são os mais distantes, ou seja, são aqueles que apresentam maior influência na resposta.

Dentre todas as variáveis discretas que foram avaliadas pelo trabalho, a que mais influenciou foi a variável 5 (Aeração) que se encontra com o valor negativo no gráfico normal de efeitos, ou seja, significa que a presença de aeração é altamente eficaz na resposta do experimento em porcentagem lipídica.

A variável 1 (meio de cultivo) e variável 2 (luminosidade), demonstram um efeito em dupla (Efeito 12) com valor negativo igual a -3,06, ou seja, significa que com um menor tempo de cultivo (15 dias) e com menor incidência luminosa (2 lâmpadas tipo luz do dia), o resultado do rendimento lipídico pode ser aumentado.

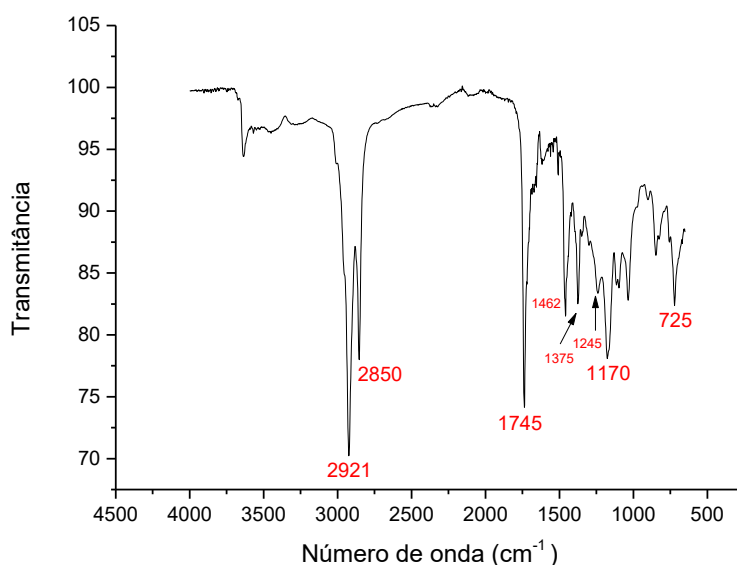
O efeito 24, que são as variáveis 2 (luminosidade) e a variável 4 (tempo de cultivo), apresentam efeito em dupla com um valor de resposta positivo, ou seja, o tempo de cultivo de 30 dias com uma maior incidência de luz favorece o rendimento de porcentagem de lipídeos.

Contudo, para a composição da seguinte fase experimental, ficou definido que o cultivo das microalgas deveria manter com as variáveis através das respostas mais significativas, ou seja, quantidade de 3 lâmpadas uma maior incidência luminosa, o meio de cultivo CHU, utilizando o fotobiorreator vertical com o período de 30 dias e a presença do sistema de aeração.

### 7.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Foi realizada a análise de espectroscopia na região do infravermelho na amostra de biodiesel etílico *in situ* da microalga *Scenedesmus* sp. a fim de avaliar os principais grupos funcionais presentes no biodiesel produzido. A Figura 17, apresenta o espectro obtido.

Figura 17: Espectro obtido na região do infravermelho para o biodiesel *in situ* produzido.



Foi observado, várias bandas identificáveis que podem ser relacionadas as estruturas conhecida dos ésteres. Na região próxima a  $3000\text{ cm}^{-1}$  estão os estiramentos simétricos e assimétricos relacionados às ligações (C–H) ( $\nu_{\text{C–H}} = 2850\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{\text{C–H}} = 2921\text{ cm}^{-1}$ ), que também produzem as deformações simétrica e assimétrica em  $1460\text{ cm}^{-1}$  e  $1375\text{ cm}^{-1}$  e a deformação em  $725\text{ cm}^{-1}$  referente às ligações (C–H) fora do plano. (CASTILHO-ALMEIDA, et al., 2012).

Em 1745  $\text{cm}^{-1}$  tem-se o estiramento intenso característico dos grupamentos carbonila (C=O) e em 1245  $\text{cm}^{-1}$  a deformação atribuída ao grupo (C–C(C=O)–O) (RIZZI, 2008).

O pico intenso em 1170  $\text{cm}^{-1}$  refere se deslocamentos do estiramento referente ao grupamento (C–O), para os ésteres. (RIZZI, 2008; CASTILHO-ALMEIDA, et al., 2012).

#### 7.4 Análise Cromatográfica

A Figura 18, apresenta o cromatograma obtido por CG-MS para a amostra de biodiesel etílico *in situ* da microalga em questão, a Tabela 11 demonstra as porcentagens relativas de cada éster na composição de sua mistura, calculadas a partir da área dos picos obtidas pelo cromatograma.

Figura 18: Cromatograma dos ésteres etílicos do biodiesel *in situ* de microalgas. Condições de análise: Temperatura inicial 70°C por 3 minutos, incremento de 10°C/min até 200°C por 5 minutos, (\* indica impurezas). Modo: Splitless, temperatura do injetor: 240°C, coluna Rtx-Wax de 0,30 m x 0,25 mm.

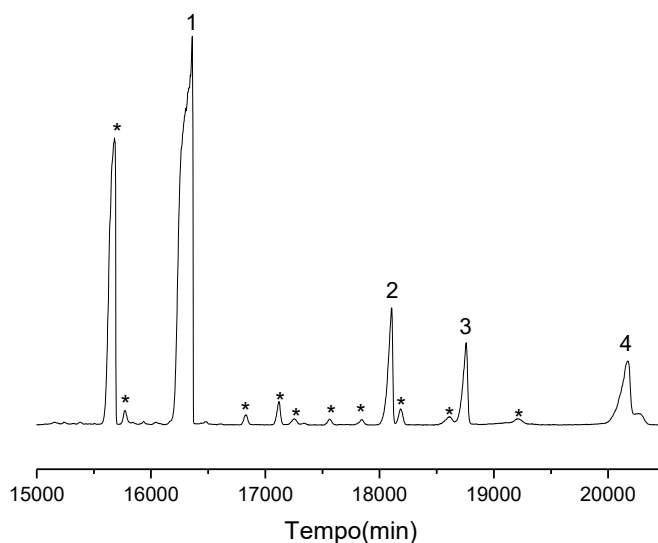
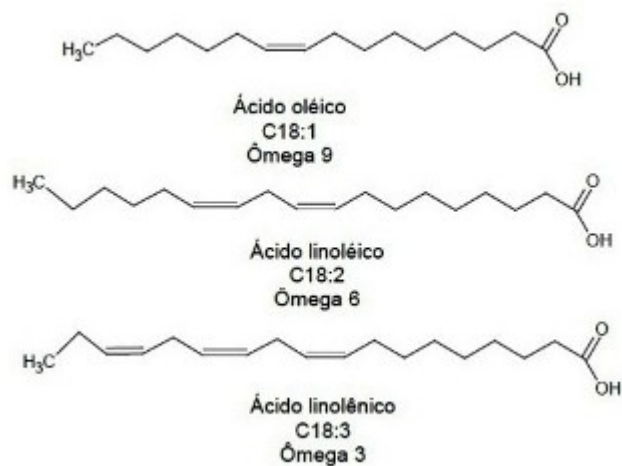


Tabela 11: Relação dos ésteres encontrados e porcentagens relativas de cada um

Pico	Composição	Ácido graxo precursor	Porcentagem relativa%
1	Padrão interno (metil heptadecanoato)	C17	-----
2	Oleato de etila	C18:1	36,6
3	Linoleato de etila	C18:2	33,8
4	Linolenato de etila	C18:3	29,6

As estruturas químicas dos ácidos graxos precursor encontrados na mistura, estão apresentados na Figura 19.

Figura 19: Estruturas química dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico.

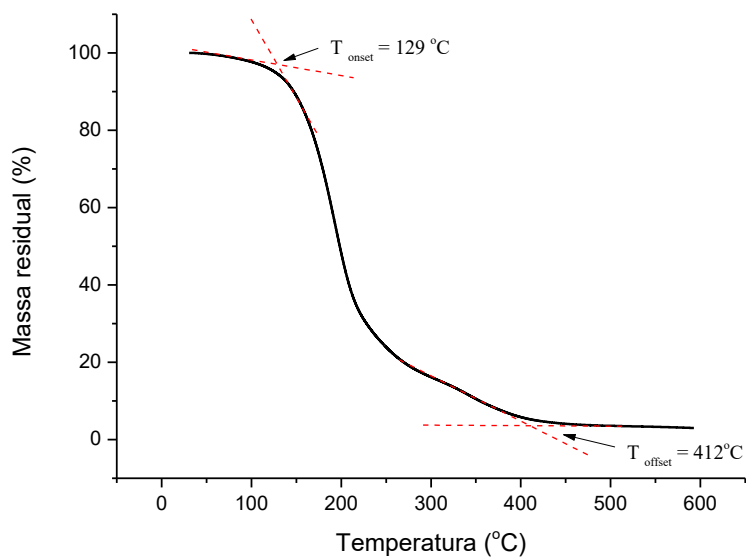


Fonte: Farias, E. S. et al., 2012.

## 7.5 Análise Termogravimétrica

A Figura 20 apresenta o termograma do biodiesel etílico *in situ* de microalgas produzido.

Figura 20: Curva TGA do biodiesel *in situ* de microalgas.



Podemos observar o início da perda de massa ocorrendo logo após os 100°C, acumulando uma perda de aproximadamente 5% de massa até os 129°C. Essa pequena perda inicial pode ser referente à liberação dos constituintes mais voláteis da mistura e solventes restantes da reação *in situ*.

O evento térmico mais significativo tem início em  $T_{\text{onset}} = 129^{\circ}\text{C}$  e prossegue até  $T_{\text{offset}} = 412^{\circ}\text{C}$ . Assume-se que esse evento corresponde majoritariamente à vaporização dos ésteres C18 presentes na amostra como verificado pela análise em CG-MS. Como podemos verificar na Tabela 12, a temperatura de ebulição dos ésteres encontrados na amostra de biodiesel *in situ* estão entre 218 e 216°C, que corresponde a faixa de temperatura com maior perda de massa segundo a análise termogravimétrica obtida. Após 412°C temos apenas cinzas do material decomposto durante a análise térmica.

Vale ressaltar que as temperaturas de ebulição apresentada na Tabela 12 correspondem aos ésteres puros e que essas temperaturas podem sofrer desvios mediante as situações de misturas, como é o caso da amostra analisada.

Tabela 12: Temperaturas de ebulição dos ésteres encontrados.

Ésteres	Ácido graxo precursor	Temperatura de ebulição em °C
Oleato de etila	C18:1	218
Linoleato de etila	C18:2	207-208
Linolenato de etila	C18:3	182

Fonte: Manual de Produtos Químicos Finas, Sigma-Aldrich, 2008

## 8. CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos do presente trabalho, foi possível concluir que as condições de estresse se fazem necessárias visando obter-se um maior rendimento de lipídeos, contudo existem algumas variáveis que podem ser melhoradas visto que a espécie de microalga *Scenedesmus* sp. segundo a literatura pode apresentar um teor lipídico superior a 30%.

Outro resultado importante obtido foi a presença do sistema de aeração nos fotobiorreatores, na qual, os que foram dotados deste sistema apresentaram ótimos valores de porcentagem lipídica de 7,12% até 19,84%.

As outras variáveis estudadas pelo planejamento fatorial, não tiveram valores de efeitos tão significativos como o sistema de aeração apresentou, por exemplo o efeito de fotobiorreatores horizontais ou fotobiorreatores verticais, ou seja, seria um ponto facultativo na escolha de qual usar para o cultivo.

Pelas análises feitas da amostra de biodiesel etílica *in situ* da microalga *Scenedesmus* sp., podemos observar que houve conversão de triglicerídeos em biodiesel (ésteres), sendo o ácido precursor predominante C:18.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 2 dez. 2019

ALMARALES ARCEO, Ángel. **Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química-EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://186.202.79.107/download/producao-de-biodiesel-da-biomassa-das-microalgas.pdf>. Acesso em: 2 out. 2019.

BAUMGÄRTNER, Tatiana Rodrigues da Silva. **Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Maringá, 2011. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/3628>. Acesso em: 2 out. 2019.

BICUDO, Carlos E. de M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. 489 p. ISBN 8576560887.  
BIODIESEL NO BRASIL. 2008. disponível em: <https://www.biodieselbr.com/>. Acesso em: out. 2019.

BORGES, Wesley da Silva. **Produção de bio-óleo empregando microalgas em diferentes meios de cultivo**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15075>. Acesso em: 2 out. 2019.



CASTILHO-ALMEIDA, Eduardo W. et al. Estudo teórico e experimental de espectros infravermelho de ésteres de ácido graxo presentes na composição do biodiesel de soja. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1752-1757, 2012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422012000900009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900009&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 2 dez. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900009>.

COUGO, Cecília Dutra Garcia. **Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em *Snedesmus sp.*** 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/163450>. Acesso em: 2 dez. 2019.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. New Zeland, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007000262>. Acesso em: 2 dez. 2019.

CHU, S. P. The influence of the mineral composition if the medium on the growth of planktonic algae. **Journal of Ecology**, v.30, n.2, p.284-325, 1942. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/cb3d/5e48ebbd2d02e344c58762433c0f5c2fd1f4.pdf>. Acesso em: 2 dez.2019.

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782006000600050&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000600050&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 2 dez.2019

DZUMAN, Maria Judite. **Efeito da Reciclagem Repetida do Meio de Cultivo da Microalga *Scenedesmus sp.* Para a Produção de Biodiesel.** 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/36784>. Acesso em: 2 dez. 2019.

EMBRAPA AGROENERGIA, **Agroenergia em revista: microalgas**, 2016. Brasília, DF, v. 4, n.10, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1060364/agroenergia-em-revista-microalgas>. Acesso em: 2 dez. 2019.

ESPINOSA, Lauren et al. AS MICROALGAS COMO FONTE DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL: DISCUSSÃO DE SUA VIABILIDADE. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 2, n. 1, 2014. Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/ojs/index.php/ast/article/view/58>. Acesso em: 02 dez. 2019.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 497-509, 1956. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/226/1/497.long>. Acesso em: 2 dez. 2019.

FOUNTOURA, Juliana Tolfo da. **Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual**, 2017. Tese (Doutorado em Engenharia: Departamento de Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/173885>. Acesso em: 2 dez. 2019.

FRANCO, André Luiz Custódio et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422013000300015&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422013000300015&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 02 dez. 2019.

GREENWELL, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of The Royal Society Interface**, v.7, p. 703-726, 2010. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsif.2009.0322>. Acesso em: 2 dez. 2019

GRIS, Lara Regina Soccol. **Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em Fotobiorreator Airlift**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química: Departamento de Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/29403>. Acesso em: 2 dez. 2019

GUILLARD, R. R. L. **Culture of marine invertebrate animals**. Plenum, New York, USA, P.29-6, 1975. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4615-8714-9.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2019

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p. ISBN 8521614233.

LEWIS, T., NICHOLSB, P. D., MCMEEKINA, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, 2000, v. 43, p. 107-116. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701200002177> . Acesso em: 2 dez. 2019.

LI, Yuesong. et al. One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis* sp. on solid base Mg-Zr catalyst. **Applied Energy**, v.88, n.10, p.3313- 3317, 2011. Disponível em: [https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:44113590](https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:44113590). Acesso em: 2 dez. 2019

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. Brasil: RiMa,2006.

MENEGHETTI, S. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C. A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.1, 2013. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/389>. Acesso em: 2 dez. 2019

OHSE, Silvana et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 7-18, set. 2011. ISSN 2175-7925. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2008v21n2p7/18899>. Acesso em: 02 dez. 2019

OLIVEIRA, Carlos de Jesus de. et al. Produção de Biodiesel a partir das algas: uma revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, Umarama, v.3, p.202-221, 2014. Disponível em: <http://www.dca.uem.br/V3NE/16.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2019

PENA, A. de C. C., FONTOURA, J. T. Da.; TRIERWEILER, L. F.; GUTTERRES, M. 2017. Estudo de um consórcio de microalgas na remoção de nutrientes de efluentes de curtume. **Revista Eletrônica Científica Da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 743-752, 2017. Disponível em: <http://revista.uergs.edu.br/index.php/revuergs/article/view/1040>. Acesso em: 2 dez. 2019

RÍOS PINTO, Luisa Fernanda. **Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a produção de biodiesel**. 2014. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia

Química, Universidade Estadual de Campinas, SP. Disponível em:  
<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266120>. Acesso em: 2 dez. 2019.

RINALDI, Roberto et al. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1374-1380, 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000500054&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000500054&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 2 dez. 2019

RIZZI, Marlize. **Aplicação do método enxame de partículas na otimização de modelos de regressão multivariada aplicados na quantificação da mistura biodiesel/óleo vegetal/diesel**. 2008. Dissertação (Mestrado em Sistemas e Processos Industriais) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unisc.br/jspui/handle/11624/664>. Acesso em: 2 dez. 2019

SANT'ANNA, Célia Leite, et al. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras**. Instituto de Botânica, São Paulo, 2012. Disponível em: [https://www.academia.edu/40779032/Atlas\\_de\\_cianobact%C3%A9rias\\_e\\_microalgas\\_de\\_%C3%A1guas\\_continentais\\_brasileiras](https://www.academia.edu/40779032/Atlas_de_cianobact%C3%A9rias_e_microalgas_de_%C3%A1guas_continentais_brasileiras). Acesso em: 2 dez. 2019

SILVA, Débora Andreatta da. **Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodiesel**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: setor de tecnologia), Universidade Federal do Paraná, 2014. Disponível em: <http://www.pipe.ufpr.br/portal/defesas/dissertacao/266.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2019

STREIT, Nivia Maria et al. As clorofilas. **Ciência. Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, Junho, 2005. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782005000300043&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000300043&lng=en&nrm=iso) . Acesso em: 2 dez. 2019

YUAN-KUN, L.; HUI, S. Handbook of Microalgal Culture: **Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, p.40-56, 2004. Disponível em:

[https://www.academia.edu/35862840/Handbook\\_of\\_Microalgal\\_Culture](https://www.academia.edu/35862840/Handbook_of_Microalgal_Culture). Acesso em: 2 dez. 2019