

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA – MESTRADO

**INFLUÊNCIA DA PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DA MICROALGA
Chlamydomonas reinhardtii VISANDO A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS**

JONAS FELIPE RECALCATTI

**TOLEDO – PR – BRASIL
Setembro de 2016**

JONAS FELIPE RECALCATTI

**INFLUÊNCIA DA PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DA MICROALGA
Chlamydomonas reinhardtii VISANDO A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, área de concentração em **Biocombustíveis**.

Orientador: Prof. Dra. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner.

**TOLEDO – PR - BRASIL
Setembro de 2016**

*Às minhas duas Mães, Aide e Solfira (in
memorian) as quais devo tudo o que sou e
por estar onde estou.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela maravilhosa oportunidade da vida e de realizar este sonho. Ele sabe o quanto isso tudo importa pra minha vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner, pela orientação e auxílio na condução deste trabalho.

Ao meu companheiro Sidy, por me apoiar em todas as etapas, sempre incentivando a seguir em frente nos estudos. Pela companhia, paciência e compreensão. Tu sabes como és importante para mim. Te amo muito!

À minha família, pelo apoio em todas as etapas de meus estudos. Em especial a minha mãe, mulher batalhadora, meu espelho e minhas melhores influências na vida e no trabalho e à minha sobrinha Mariane pela compreensão, torcida pelo meu sucesso, carinho e auxílio em tudo que preciso. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus verdadeiros amigos, familiares, Daniela, Heloisa e Nakiely pelas orações, companheirismo e pelas palavras de força nos momentos mais difíceis de ultrapassar. Vocês são importantes em minha vida.

Aos amigos e colegas de mestrado, Andrielle, Camila, Cris, Guilherme, Kátina, Simone e Viviane, por todos os momentos compartilhados durante esse período e principalmente pela amizade que fica. Vocês sempre serão lembrados por mim.

As instituições UNIOESTE, UTFPR e UDC pela disponibilização da estrutura física e equipamentos para realização das várias etapas deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem. Ou que seus planos nunca vão dar certo. Ou que você nunca vai ser alguém [...]. Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo. Quem acredita sempre alcança!”.

(Renato Russo – Mais Uma Vez)

“Dê seu primeiro passo com fé. Não é necessário que veja todo o caminho, só dê seu primeiro passo.”

(Martin Luther King Jr.)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Biocombustíveis.....	4
3.2 Microalgas	8
3.3 Microalgas e a produção de energia	10
3.4 Microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12
3.5 Cultivo de microalgas	13
3.5.1 Sistemas de cultivo.....	14
3.5.1.1 Cultivo fechado ou fotobiorreator	14
3.5.1.2 Cultivo aberto ou tanques	15
3.5.2 Condições de cultivo	16
3.5.3.1 Temperatura	18
3.5.3.3 Aeração.....	19
3.5.3.4 pH	20
3.5.3.5 Nutrientes	20
3.5.4 Recuperação da biomassa.....	21
3.6 Cinética de crescimento das microalgas	22
3.7 Nitrogênio e cultivo das microalgas.....	25
3.8 Lipídeos e composição celular das microalgas	26
3.9 Extração do óleo de microalgas	31
3.10 Biodiesel de microalgas	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Cultivo da microalga.....	37
4.2 Cinética de crescimento	39

4.3 Recuperação da biomassa	39
4.4 Teor de clorofila a e b	40
4.5 Determinação das proteínas totais.....	40
4.6 Determinação de matéria seca, mineral e umidade	41
4.7 Determinação das fibras totais	42
4.8 Determinação dos carboidratos totais	43
4.9 Extração do óleo	43
4.10 Determinação da composição dos ácidos graxos do óleo extraído.	44
4.11 Análises cromatográficas.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Cultivo da microalga.....	46
5.2 Recuperação da biomassa	49
5.3 Teor de clorofila a e b	51
5.4 Determinação de proteínas e carboidratos totais	52
5.5 Extração dos lipídeos	53
5.6 Determinação da composição dos ácidos graxos do óleo extraído....	58
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de diferentes microalgas de água doce e marinha em percentual de peso seco total.....	10
Tabela 2. Características das condições de cultivo.....	17
Tabela 3. Rendimento da extração de óleo em diferentes espécies de oleaginosas.	29
Tabela 4. Solução de sais.	37
Tabela 5. Solução de fosfatos.	37
Tabela 6. Solução elemento traço.....	38
Tabela 7. Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cultivada no meio TAP - com e sem nitrogênio.	46
Tabela 8. Teor de Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> (mg.L^{-1}) de <i>C. reinhardtii</i> em cultivo com e sem nitrogênio.....	51
Tabela 9. Teor de Proteínas totais e Carboidratos totais na biomassa de <i>C. reinhardtii</i> cultivada cultivada com e sem nitrogênio (%).	52
Tabela 10. Massa de lipídeos totais da extração do óleo da microalga <i>C. reinhardtii</i> pelo método Bligh e Dyer (1959), adaptado por Chen et al. (2012).	53
Tabela 11. Composição em ácidos graxos (%) do óleo de <i>C. reinhardtii</i> , cultivada com e sem nitrogênio obtida por cromatografia gasosa.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral de reação de esterificação	7
Figura 2. Reação de transesterificação	7
Figura 3. Esquema da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12
Figura 4. Cultivo de microalgas em sistema fechado	14
Figura 5. Cultivo de microalgas em sistema aberto (lagoas)	15
Figura 6. Curva de crescimento de microalgas em cultivos fechados.....	23
Figura 7. Molécula de triacilglicerol.....	27
Figura 8. Cultivo da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	38
Figura 9. Concentração de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , cultivada no meio TAP - com e sem nitrogênio, em função do período de cultivo	47
Figura 10. Recuperação da biomassa: a) Decantação após adição do floculante; b) filtração; c) recuperação da biomassa e d) biomassa algácea seca	50
Figura 11. Biomassa seca e triturada: a) Biomassa proveniente do cultivo com nitrogênio; b) biomassa proveniente do cultivo sem nitrogênio.....	50
Figura 12. Valores médios do teor lipídico extraído em diferentes temperaturas da microalga <i>C. reinhardtii</i> cultivada em meio com e sem nitrogênio.....	54
Figura 13. Conteúdo lipídico extraído em diferentes temperaturas da microalga <i>C. reinhardtii</i> cultivada em meio com e sem nitrogênio	55
Figura 14. Extração do óleo da microalga <i>C. reinhardtii</i> pelo método Bligh e Dyer (1959), adaptado por Chen et al. (2012) - Sistema bifásico com solventes (clorofórmio/metanol/água)	56

LISTA DE ABREVIATÓES E SIGLAS

AGS – Ácidos graxos saturados

AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados

AGPI – Ácidos graxos poli-insaturado

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

° C – Graus Celsius

CN – Com Nitrogênio

CO₂ – Dióxido de carbono

GEE – Gases de Efeito Estufa

G – Gramas

% – Porcentagem

mol – Unidade de quantidade de matéria

µm – Unidade de medida micrômetro

nm – Unidade de medida nanômetro

mL – Mililitros

pH – Potencial hidrogênico;

rpm – Rotação por minuto;

sp – Espécie

SN – Sem Nitrogênio

TAP – Meio de Cultivo Sintético com Elemento Traço

UNIOESTE – Universidade Estadual de Oeste do Paraná.

INFLUÊNCIA DA PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DA MICROALGA *Chlamydomonas reinhardtii* VISANDO A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS

AUTOR: JONAS FELIPE RECALCATTI

ORIENTADOR: PROF. DR. TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGARTNER.

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 08 de setembro de 2016. 89 p.

RESUMO

A necessidade de fontes alternativas de energia são exemplos de ações que podem contribuir para amenizar os problemas relacionados ao meio ambiente. Assim, os biocombustíveis surgem como uma opção que se ajusta ao desenvolvimento sustentável, pois estes são produzidos a partir de fontes de energia renováveis de forma a diminuir a emissão de gases nocivos ao ambiente. Estudos abordam as potencialidades de microalgas para a produção de biodiesel, um biocombustível obtido a partir do óleo de diversas oleaginosas e microalgas. As microalgas consistem em uma variedade de organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos, a estrutura simples das microalgas permite que elas convertam facilmente a energia solar em energia química. Desta forma, o trabalho teve como objetivo estudar o cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, em meios de cultivo com e sem nitrogênio, para extração e quantificação do óleo desta biomassa em diferentes temperaturas e análise da composição dos ácidos graxos produzidos. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi cultivada em meio com e sem nitrogênio. Após a recuperação da biomassa, esta foi analisada quanto à matéria orgânica e inorgânica, teor de clorofila *a* e *b* e por fim, foi obtido e quantificado o teor lipídico presente na biomassa, analisando-se o perfil de ácidos graxos presentes por cromatografia gasosa. A partir dos resultados obtidos com a extração, observou-se que, a supressão de nitrogênio influencia na produtividade de lipídeos, aumentando os teores destes na biomassa da microalga, quando comparado ao teor lipídico da biomassa cultivada com nitrogênio, apresentando maiores rendimentos quando extraído na temperatura de 45° C (7% CN e 11% SN), independente da condição de cultivo. A supressão de nitrogênio no meio de cultivo não interfere significativamente na composição dos ácidos graxos no óleo da biomassa algácea, predominando em sua composição ácidos graxos saturados (C 16:0) e mono-insaturados (C 14:1, C 16:1 e C 20:1), propícios para a produção de biodiesel. Os resultados obtidos demonstram que a biomassa microalga *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta potencial para produção de biodiesel, quando cultivada nas condições testadas neste estudo.

Palavras-chave: Biocombustível. Microalga. *Chlamydomonas reinhardtii*.

**INFLUENCY OF PRIVATION OF NITROGEN ON MICRO-ALGAE
Chlamydomonas reinhardtii CULTIVATION AIMING LIPIDS PRODUCTION**

AUTHOR: JONAS FELIPE RECALCATTI

SUPERVISOR: PROF. DR. TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGARTNER.

Master Thesis; Post Graduate Program in Bioenergy; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brazil, September of 2016. 89 p.

ABSTRACT

The necessity of alternative energy sources is an example of action that may contribute to diminish environment related issues. Thus, biofuels rise as an option that fit to sustainable development, because they are produced from renewable sources of energy in order to reduce harmful gas emissions to the environment. Studies approach the potential of micro-algae to produce biodiesel, a biofuel obtained from the oil of oilseeds and micro-algae. The micro-algae consist of a variety of autotrophic, prokaryotic or eukaryotic organisms. Their simple structure allows them to easily convert solar energy into chemical energy. The products of this conversion are been used to obtain biomass from micro-algae and, consequently, products of commercial applications. Some micro-algae contain high levels of lipid, showing the potential of these microorganisms to produce biofuels. In this way, the objective of this paper was to study the micro-algae *Chlamydomonas reinhardtii* cultivation, growing with and without nitrogen, for the extraction and quantification of oil from this biomass in different temperatures and the analysis of the composition of the fatty acids produced. From the results obtained with the extraction, it has been seen that the deletion of nitrogen influence lipids productivity, rising the levels of the lipids on the micro-algae biomass when compared to lipids levels of the biomass cultivated with nitrogen, showing better outcomes when extracted at the temperature of 45° C (7% with nitrogen and 11% without nitrogen), independently of cultivation conditions. The deletion of nitrogen on the cultivation does not interfere significantly with the composition of the fatty acids in the oil of the biomass from the micro-algae. What predominates in its composition are saturated fatty acids (C 16:0) and mono-unsaturated (C 14:1, C 16:1 and C 20:1), propitious to biodiesel production. The results obtained show that the biomass *Chlamydomonas reinhardtii* micro-algae has the potential to produce biodiesel, when cultivated on the conditions tested on this paper.

Key-words: Biofuel. Micro-algae. *Chlamydomonas reinhardtii*.

1 INTRODUÇÃO

As questões relacionadas à degradação do meio ambiente tem sido uma preocupação em todo o cenário mundial. Uma das formas encontradas para minimizar o aquecimento global é a substituição gradual das fontes de energia liberadoras de gases de efeito estufa, por alternativas capazes de suprir a demanda energética de maneira menos poluidora.

A necessidade de fontes alternativas de energia e de práticas ecologicamente corretas são exemplos de ações que podem contribuir para amenizar os problemas relacionados ao meio ambiente. Assim, os biocombustíveis surgem como uma opção que se ajusta ao desenvolvimento sustentável (MATA; MARTINS; CAETANO, et al., 2010).

Biocombustível é definido comumente como um combustível proveniente de materiais biológicos, podendo ser matéria orgânica morta e também proveniente de produtos metabólicos de organismo vivos. São amplamente produzidos a partir de fontes de energia renováveis, tais como a soja, mamona, dendê, girassol e canola, sendo que o biodiesel e bioetanol são os mais comumente comercializados (DERMIBAS, 2009).

Atualmente, a biomassa das microalgas tem sido amplamente estudada para fins energéticos, apresentando um enorme potencial para produção de biocombustíveis (COUTO et al., 2010). Diversos estudos abordam as potencialidades de microalgas para a produção de biodiesel, principalmente por se tratar de uma prática socioeconômica muito promissora e por não competir com espécies utilizadas na alimentação humana (MATA; MARTINS; CAETANO, et al., 2010; PEQUENO et al., 2012).

As microalgas compreendem uma variedade de organismos autotróficos de estrutura simples, o que permite que elas convertam facilmente a energia solar em energia química, produzindo uma série de substâncias que são utilizadas para consumo humano, suplementos, fármacos, polímeros, biofilmes, biorremediação e na produção de biocombustíveis (ARAUJO et al., 2012). Esses microorganismos representam uma excelente alternativa para a produção de energia, dada à elevada taxa de duplicação de biomassa e produção de óleo, os quais podem ser transesterificados em biodiesel (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Chlamydomonas reinhardtii é uma alga unicelular, verde, com uma distribuição geográfica muito abrangente, com potencial produção de óleos, que pode chegar a 21% de sua massa seca, representando portanto, uma espécie promissora para extração de óleo e posterior produção de biocombustíveis (MARÍN-NAVARRO et al., 2010). A biomassa desta e das demais espécies de microalgas é produzida por meio de sistemas de cultivo, no qual são ofertados condições e nutrientes para o desenvolvimento das mesmas. Dentre estes nutrientes, os mais importantes para o metabolismo microalgal, são o carbono, o nitrogênio e o fósforo (RICHMOND, 2004).

Para produzir quantitativa e qualitativamente biodiesel a partir de microalgas, faz-se necessário que a espécie cultivada apresente altas taxas de crescimento e um alto rendimento de lipídios (SHEEHAN et al., 1998).

Um acúmulo significativo de lipídios na biomassa das microalgas, geralmente está associado a períodos de estresse e deficiência de nutrientes (FAO 2009). O nitrogênio é o nutriente que mais afeta a produção e armazenamento de lipídeos nas microalgas (PIORRECK; BAASCH; POHL, et al., 1984). Estudos revelam que cultivos onde o nitrogênio é um fator limitante, a porcentagem de lipídeos em relação à massa total aumenta consideravelmente (HU et al., 2008).

Essa tendência tem influenciado em produzir microalgas, onde este nutriente seja suprimido, levando a condições ótimas de produção de lipídeos, que podem ser obtidos por diferentes métodos de extração, possibilitando obter uma quantidade de óleo maior e com um custo cada vez menor, tornando assim, as microalgas, uma excelente matéria prima para produção do biodiesel e conseqüentemente, minimizar vários impactos ao meio ambiente (FRANCO et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Cultivar a biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, sob diferentes cultivos, visando à produção de lipídeos.

2.2 Objetivos específicos

- Obter da biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, em meios de cultivo com e sem nitrogênio;
- Avaliar a influência da condição de cultivo, quanto ao teor de clorofilas *a* e *b*, carboidratos e proteínas na biomassa algácea;
- Extrair e quantificar o óleo da biomassa das duas condições de cultivo em diferentes temperaturas e posterior esterificação;
- Analisar a composição lipídica dos ésteres produzidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis derivados de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica morta que não esteja fossilizada, e também proveniente de produtos metabólicos de organismo vivos, podendo ser vegetal, animal ou microrganismo (DERMIBAS, 2009).

Os biocombustíveis são recursos sem toxicidade, biodegradáveis, renováveis e ambientalmente corretos, o que os torna uma alternativa energética cada vez mais explorada, já que permitem a redução de emissões de poluentes, principalmente os gases de efeito estufa (DELALIBERA, 2009).

O registro do uso de combustível data desde os primórdios da humanidade quando o fogo foi descoberto. A partir daí, a madeira passou a ser um dos principais combustíveis sólidos consumidos no mundo. Com o passar dos anos, novos combustíveis foram descobertos, como por exemplo, os óleos e gorduras animais (SILVA; FREITAS, 2008).

Foi na Segunda Guerra Mundial que ocorreu a primeira grande demanda a nível internacional por biocombustíveis, onde estes eram alternativas ao combustível importado. Na década de 70, devido às instabilidades políticas e constantes guerras no Oriente Médio, ocorreu o primeiro choque do petróleo. A partir de então, por questão de segurança energética, diversos países começaram a investir em combustíveis alternativos ao petróleo. Nessa época, no Brasil, surgiu o Pró - Álcool, o programa Brasileiro de substituição de derivados de petróleo por etanol produzido a partir da cana de açúcar (CHISTI, 2007).

Desde os primórdios da indústria automobilística, os biocombustíveis são utilizados no setor de transportes. Atualmente o processo de utilização dos biocombustíveis ainda é o mesmo utilizado no passado. As matérias prima também são muito semelhantes, no entanto, o amendoim, o cânhamo, o óleo de milho e o sebo de animais foram parcialmente substituídos por soja, colza, resíduos florestais, cana-de açúcar, algas, entre outros (LUQUE et al, 2008).

Foi somente durante a Segunda Guerra Mundial e pós-guerra, quando houve a escassez de petróleo devido a problemas na sua distribuição e falta de recursos, que surgiu o interesse na utilização de biocombustíveis à base de óleo. No entanto,

até que fossem extremamente necessário novamente, os biocombustíveis permaneceram na obscuridade (DELALIBERA, 2009).

O Brasil, Estados Unidos, Alemanha, França e Suécia são atualmente os líderes mundiais em desenvolvimento e utilização de biocombustíveis. Nota-se que em países onde a indústria de biocombustíveis é bem estabelecida, que as primeiras e principais matérias primas a serem utilizados sejam as culturas economicamente mais importantes para o país (por exemplo, o milho nos EUA, a colza na União Europeia e cana-de-açúcar no Brasil) (FAO, 2010). Em vista destes fatos, ações governamentais, principalmente nos países desenvolvidos, tem incentivado diversos estudos e pesquisas, com o intuito de, aumentar a produtividade através de modificação genética das culturas existentes, ou encontrar alternativas viáveis para suprir a demanda sem causar maiores impactos sobre o meio ambiente e o abastecimento de alimentos (KOWALSKI, 2010).

Nessa mesma época, a pesquisa e a implementação de novos biocombustíveis à matriz energética brasileira continuava em alta e, em 2005, foi lançado o Programa de Biodiesel modificando mais uma vez a matriz energética brasileira para combustíveis veiculares. Em 2010, já era obrigatória a adição de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo (DALALIBERA, 2009).

Os biocombustíveis de modo geral, podem ser classificados tanto como combustíveis sólidos quanto líquidos, bem como gases. A madeira, resíduos de agricultura, como casca de arroz, são exemplos de e biocombustível sólidos, o etanol produzido pela fermentação e o biodiesel, que possui como, matéria prima para a sua produção, diversos tipos de óleos vegetais oriundos das mais diversos tipos de cultivo, são exemplos de biocombustíveis líquidos mais conhecidos (SILVA; FREITAS, 2008).

Recentemente, as microalgas tem demonstrado uma enorme potencialidade como matéria prima para produção de biocombustíveis, e vem sendo objeto de estudo para fins energéticos, principalmente pelos Estados Unidos, através do Programa de Espécies Aquáticas desde a década de 70 (FAO, 2010). Tanto a nível mundial como nacional, diversas pesquisas começaram a surgir com o objetivo de cultivar esses organismos para uma produção em larga escala de biomassa para fins energéticos, principalmente o biodiesel (CHISTI, 2007).

O biodiesel é definido como 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 (Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005).

Mundialmente, o biodiesel surgiu como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais, derivados do petróleo, sendo um grande aliado no combate do aquecimento global e a poluição, estabilizando a concentração de CO₂ na atmosfera. Além disso, o biodiesel substitui o óleo diesel sem que sejam necessários ajustes no motor (CHISTI, 2007)

Comparando-se com diesel oriundo do petróleo, o biodiesel apresenta alta eficiência de combustão, emissão reduzida de CO₂, CO, sulfatos, compostos aromáticos e particulados na combustão, menor risco de transporte, armazenamento e manipulação, é biodegradável, tem elevado ponto de fulgor e lubricidade e a matéria-prima utilizada é de fácil obtenção (AHMAD, 2011).

Por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o Governo Federal organizou a cadeia produtiva, definiu as linhas de financiamento, estruturou a base tecnológica e editou o marco regulatório do uso do biodiesel. Na matriz energética do país, o percentual de 2% de mistura deste biocombustível passou a ser obrigatória a partir de janeiro de 2008. Em janeiro de 2010, esse percentual foi ampliado sucessivamente até atingir 5%, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei Nº 11.097 de 2005 (BIOCOMBUSTIVEIS, 2012).

Entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, o Brasil conta com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada para cerca de 5,8 bilhões de litro (ANP, 2016).

Existem hoje, alguns métodos eficazes para a produção de biodiesel através da transformação da matéria prima. As reações mais conhecidas para isso são o craqueamento, a esterificação e a transesterificação (CHISTI, 2013).

O craqueamento térmico ou pirólise é a conversão de uma substância em outra por meio de aquecimento, na ausência de ar ou oxigênio, podendo ter a presença ou não de um catalisador. Este processo ocorre a temperaturas superiores a 450°C (WANG; ZHANG, 2012).

A esterificação de ácidos graxos (Figura 1) ocorre utilizando-se o metanol ou etanol, que reagem com os ácidos carboxílicos livres provenientes nos óleos vegetais, formando ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente, e água (ARANDA, 2009).

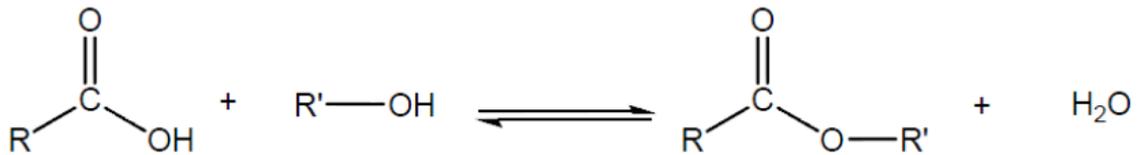


Figura 1. Esquema geral de reação de esterificação

Fonte: Haertel, 2009.

A transesterificação (Figura 2) consiste no processo de obtenção de um éster a partir de outro éster e álcool sendo que a reação é catalisada na presença de ácidos ou bases fortes. Este processo é atualmente utilizado para a obtenção do biodiesel, no qual ocorre a conversão de triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos (TABATABAEI et al., 2011).

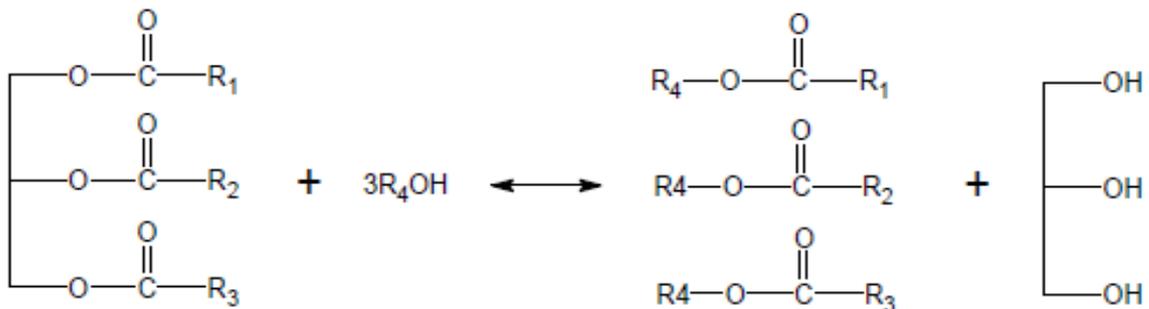


Figura 2. Reação de transesterificação

FONTTE: Araujo et al., 2012.

A transesterificação também pode ser realizada sem a presença de catalisador na reação, usando condições supercríticas de álcool. Este processo requer altas temperaturas e pressão, podendo ser conduzido em menor tempo e reduzindo significativamente os processos de separação e purificação dos produtos, (DEMIRBAS, 2005).

Além dessas formas convencionais de produção de biodiesel, a reação *in situ*, tem sido outra opção utilizada, principalmente em materiais que as tradicionais extrações com solvente não são eficientes (LEWIS; NICHOLSB; MCMEEKINA,

2000). A esterificação e/ou transesterificação *in situ* refere-se à conversão de ésteres alquílicos a partir de ácidos graxos livres e triacilglicerídeos presentes em um material biológico, envolvendo a adição de um álcool, um catalisador, a pressão atmosférica e temperaturas moderadas. Nestas reações os ésteres pode ser facilmente recuperados, uma vez que após serem produzidos se difundem para a fase líquida (HAAS; WAGNER, 2011).

Atualmente várias pesquisas surgem, buscando matérias-primas alternativas para a produção de biodiesel, dentre essas matérias à biomassa de microalgas se destaca.

3.2 Microalgas

Plantas, algas e algumas espécies de bactérias, são organismos fotossintetizantes. No grupo das algas é possível dividi-las em macroalgas e microalgas. As microalgas são seres microscópicos, encontrados tanto em ambientes marinhos, quanto em água doce (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

São organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos, cujas células possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidrato, proteína, lipídios, ácidos graxos, etc.). Em média, 40 a 50% de todo oxigênio disponível no planeta, é proveniente das microalgas. Estes microrganismos são base da cadeia alimentar, sendo responsáveis pela produção primária em uma área equivalente a 71% da superfície do planeta Terra (os oceanos), dando suporte a maior parte da vida nos ambientes aquáticos (ANDERSEN, 2005).

A categorização das algas em quatro classes é feita de acordo com os critérios morfológicos, sendo distinguidas principalmente por sua pigmentação, ciclo de vida, e estrutura celular. Segundo Sheehan et al. (1998) as quatro mais importantes classes de microalgas em termos de abundância são:

- a) Algas verdes (Chlorophyceae): são abundantes em água doce. Na escala evolutiva, foram as que deram origem aos vegetais superiores. O principal composto de estoque é o amido, sendo que em certas condições específicas produzem lipídeos de maneira considerável;

- b) Diatomáceas (Bacillariophyceae): são as principais microalgas do fitoplâncton dos oceanos, mas também são encontradas em águas doce e salobra. Existem aproximadamente 100.000 espécies. Contém sílica em sua parede celular. Estocam carbono na forma de lipídios ou carboidratos;
- c) Cianobactérias (Cyanophyceae): possuem morfologia muito próxima a das bactérias. São encontradas em diferentes habitats, verificando-se aproximadamente 2.000 espécies. Desempenham um importante papel na fixação de nitrogênio atmosférico.
- d) Algas pardas (Chrysophyceae): apresentam coloração marrom, amarelo e alaranjado e pigmentos bastante complexos. Produzem como compostos de estoque, lipídios e carboidratos. Sabe-se da existência de aproximadamente 1.000 espécies, encontradas principalmente em água doce.

A maioria das espécies de microalgas de interesse para produção de compostos voltados a produção de energia, estão distribuídas dentro dos grupos das cianobactérias ou das clorófitas (LEE, 2008).

Nas microalgas a conversão de energia solar em energia química é facilitada devido a estrutura unicelular desses organismos. Essa conversão bioquímica está sendo aproveitada comercialmente para a obtenção de biomassa de microalgas e, conseqüentemente, de produtos de aplicação comercial (BRENNAN; OWENDE, 2010). A capacidade de produzir grandes quantidades de biomassa por unidade de tempo revela a importância destes microrganismos para fins tecnológicos (MIAO; WU, 2006).

Existem inúmeras pesquisas com o objetivo de cultivar esses organismos para uma produção em larga escala de biomassa para diversos fins, principalmente focando o potencial biotecnológico, identificando as diversas substâncias sintetizadas por estes organismos (MANDAL; MALLICK, 2009).

Entre as diferentes espécies de microalgas, os níveis de carboidratos, proteínas e lipídios, presentes na biomassa de microalgas, variam quantitativamente e qualitativamente, conforme demonstra Tabela 1.

Tabela 1. Composição química de diferentes microalgas de água doce e marinha em percentual de peso seco total.

Espécie	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
Dulciaquícolas			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
Marinhas			
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Pavlova lutheri</i>	49	31	12
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	33	24	10
<i>Skeletonema costatum</i>	37	21	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	29	17	10
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7

Fonte: Adaptado de Arredondo-Vega e Voltolina, 2007

3.3 Microalgas e a produção de energia

Atualmente a biomassa de microalgas tem sido utilizada em larga escala para diversos fins. Aplicações na alimentação animal e humana, na aquicultura, no tratamento de efluentes, nas indústrias de fármacos, cosméticos e alguns polímeros, na produção de energia e até mesmo na medicina, são alguns exemplos de segmentos que tem aproveitado esses microrganismos (BECKER, 2004; SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

A biomassa de microalgas pode ser utilizada para geração de eletricidade, por meio da combustão direta. Diferentes tipos de biocombustíveis como etanol,

acetona, butanol, metano, hidrogênio, bio-óleo, carvão ou biodiesel, podem ser produzidos a partir da biomassa, através da conversão química, bioquímica ou termoquímica (TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2005).

A ideia do uso de microalgas como fonte de biocombustíveis adquire grande relevância na medida em que o mundo se confronta com uma crise energética devido à depleção dos recursos finitos do petróleo e outros combustíveis fósseis, os quais, devido ao seu uso crescente e continuado desde a industrialização, têm constituído uma fonte de poluição e degradação ambiental, ameaçando gravemente a biodiversidade e com consequências catastróficas na saúde humana (LOURENÇO, 2006).

Brannan et al. (2010), citam algumas vantagens do uso de biocombustíveis derivados de microalgas:

- Durante o ano todo pode-se produzir microalgas;
- Em comparação com as melhores oleaginosas, há um melhor rendimento na produção de óleo a partir das microalgas;
- Reduz gastos hídricos, pois apesar do cultivo se dar em meio aquoso, precisam de menos água que culturas terrestres;
- Microalgas têm um rápido crescimento e a maioria das espécies possuem o teor de óleo na faixa de 20-50% do peso seco da biomassa;
- Muitos nutrientes utilizados no cultivo de microalgas, podem ser obtidos de águas residuais, tendo portanto, um potencial duplo no tratamento de efluentes orgânicos;
- No cultivo de microalgas não são utilizados herbicidas ou outros agrotóxicos;
- Valiosos co-produtos podem ser produzidos a partir do cultivo de microalgas, tais como proteínas e biomassa residual, que podem ser utilizado como alimento ou fertilizante, ou gerar biocombustíveis de segunda geração, como etanol, por exemplo.
- O rendimento do óleo pode ser potencialmente aumentado, pois pode-se modular a composição bioquímica da biomassa pela variação das condições de cultivo.

Todos esses benefícios, aliados ao fato de que a produção de biocombustíveis a partir de microrganismos fotossintetizantes, contribui

significativamente para redução da emissão de gases de efeito estufa, tem demonstrado que utilização de microalgas para geração de energia, é um método promissor.

3.4 Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii é uma alga verde, unicelular, de água doce. Tem forma oval com cerca de 10µm de comprimento e 3µm de altura e possui dois flagelos na região anterior medindo 10 a 12µm de comprimento que são utilizados para sua locomoção e reprodução. Esta espécie possui parede celular constituída principalmente de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e com pouca celulose, um número variável de mitocôndrias e um único e grande cloroplasto ocupando grande parte do citoplasma, onde está localizado todo o aparelho fotossintético (MERCHANT et al., 2007).

A membrana nuclear é contínua com o retículo endoplasmático, sendo menos extensa do que nos organismos superiores. Na extremidade anterior da célula, são encontrados dois vacúolos contrácteis. As mitocôndrias estão distribuídas por todo o citoplasma (OSTA et al., 2007). A Figura 3 demonstra a estrutura da microalga.

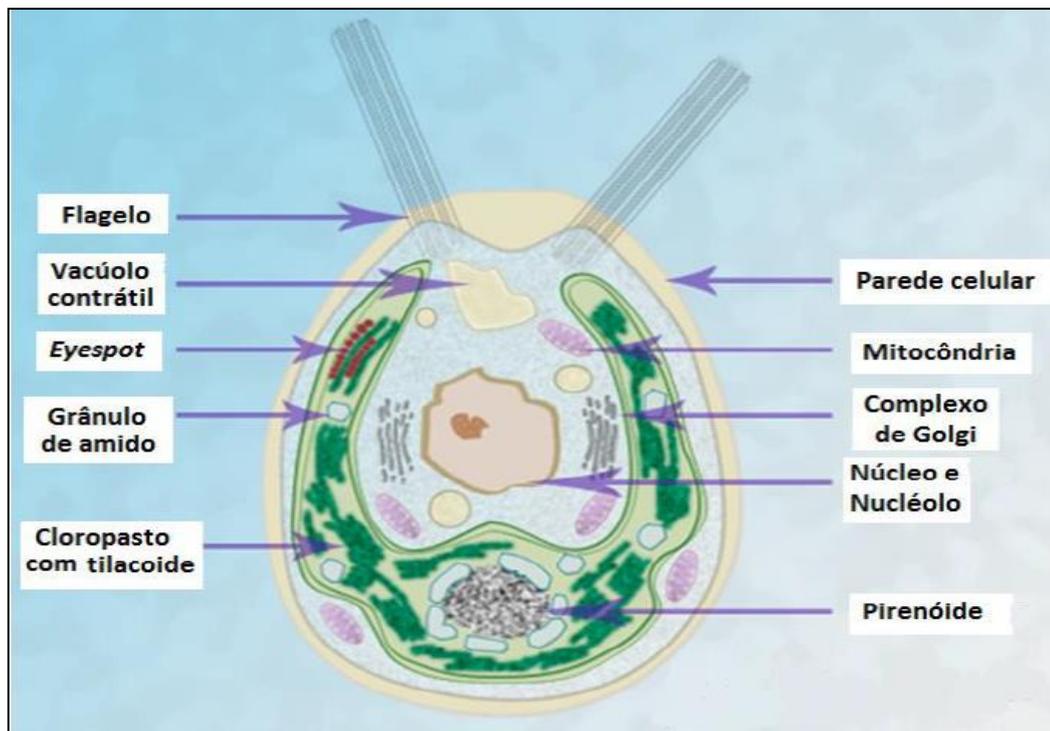


Figura 3. Esquema da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*
Fonte: Villela, 2014.

Esta microalga pode ser manipulada através de técnicas microbiológicas básicas e é um organismo não patogênico. Segundo Morowvat e colaboradores (2010) *Chlamydomonas sp.* reúne várias propriedades, tais como, o fácil manuseio e o crescimento rápido, a elevada taxa de crescimento, com ciclo de vida rápido, e o teor de lipídios necessitando apenas de um meio de cultura simples e barato, fazem desta microalga uma candidata valiosa para a produção de biodiesel. São poucos os estudos realizados sobre o processo de produção de biodiesel recorrendo a esta espécie.

O uso de *Chlamydomonas* na obtenção de bioóleo para produção de biodiesel esta em ascensão. Em trabalhos realizados por Martinz (2012), pelo método de extração de lipídios totais da biomassa de *Chlamydomonas sp.* e posterior transformação em biodiesel, demonstraram que o teor lipídico desta espécie foi são concordantes com o teor de lipídeos que pode estar presente na composição química microalgas do mesmo gênero, como a *Chlamydomonas reinhardtii*, com teor lipídico na ordem dos 21 % (% biomassa seca). Após esterificação, foi realizado por cromatografia gasosa a análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos do biodiesel produzido, revelando a predominância dos ésteres C16:0 (palmitato) e C18:1 (oleato) considerados ideais para a produção de biodiesel de alta qualidade, estando também presentes os ésteres C14:0 (miristato) e C18:0 (estearato).

Almeida e colaboradores (2011), descrevem os resultados preliminares sobre o teor lipídico de *Chlamydomonas*, utilizando para extração do óleo o método FOLCH (clorofórmio/metanol, 3:1), por ultrassom, demonstrando um rendimento de 20,84%, aproximando-se dos teores lipídicos de *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.5 Cultivo de microalgas

A utilização da biomassa de microalgas iniciou-se na década de 1950, quando foram realizadas pesquisas utilizando-se sistemas de cultivo de massa de microalgas, com objetivo de oferecer à população mundial uma fonte de proteína alternativa. Em 1970, iniciaram-se as pesquisas de utilização de microalgas como fontes de energia renovável, objetivando encontrar novas fontes de energia frente à crise energética vivenciada na época (FAO, 2009).

3.5.1 Sistemas de cultivo

A produção de biomassa a partir de microalgas consiste em diversas etapas até o produto final. A primeira etapa é o cultivo realizado em sistemas aberto ou fechado e tem, como principais insumos de produção, energia solar, água, CO₂ e outros nutrientes como nitrogênio e fósforo (LOURENÇO, 2006).

Nas últimas décadas, diferentes sistemas de cultivos tem sido desenvolvido, capazes de oferecer tais condições (ANDERSEN, 2005). O sistema de cultivo de microalgas voltado para geração de biocombustíveis, ainda está sendo desenvolvido, pois, precisa-se de métodos viáveis que atendam esta tecnologia. Portanto, os sistemas de cultivos descritos a seguir, ainda não são praticados em larga escala (CHISTI, 2013).

3.5.1.1 Cultivo fechado ou fotobiorreator

Nesta forma de cultivo, utiliza-se um material transparente, tubos de vidro, de plástico, policarbonato, dentre outros, que contêm as culturas, expondo-as a luz. Quando comparados a cultivos abertos, a produtividade de biomassa é maior nos fotobiorreatores (Figura 4) (CHISTI, 2007). Isso se deve ao fato de que no cultivo fechado existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo, tal como quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação e pH (DERNER et al., 2006).



Figura 4. Cultivo de microalgas em sistema fechado

Fonte: CHU et al., 2009.

Embora apresentem um custo maior de implantação e operação, demandando altas quantidades de energia para homogeneização, os fotobioreatores fechados proporcionam maior produtividade e controle da produção. Normalmente, nestes sistemas se alcançam altas concentrações celulares e produtividades (5 g L^{-1}) otimizando as condições de cultivo (FAO, 2009).

3.5.1.2 Cultivo aberto ou tanques

O cultivo de microalgas em tanques abertos (Figura 5) é mais utilizado que em sistemas fechados. A maioria dos tanques apresentam pequena profundidade visando assegurar a incidência adequada de luz solar. Plástico, concreto, fibra de vidro, alvenaria ou laminados, são alguns dos materiais que podem utilizados para fabricar os tanques. Esta forma de cultivo é constituída por canais de recirculação independentes, conhecido como pista de corrida (*raceways*), com profundidade entre 20 e 30 cm (CHISTI, 2007). Em atividades aquícolas, a produção de microalgas em pequenas escalas, utiliza tanques com profundidade de 50 cm ou mais, menores que 10 m^3 , homogeneizados por aeração (ANDERSEN, 2005).



Figura 5. Cultivo de microalgas em sistema aberto (lagoas)
Fonte: ALGAE, 2012.

No Japão e em Taiwan, um sistema de cultivo circular, com um agitador rotativo central e com 30 cm de profundidade, é utilizado para a produção da microalga *Chlorella*. Este sistema de tanques circulares é similar a alguns sistemas

utilizados para tratamento de efluentes e são muito utilizados para produção em larga escala de microalgas (MARÍN-NAVARRO; ESQUIVEL; MORENO, 2010).

Esse sistema tem sido utilizado devido ao baixo custo de implantação. Entretanto, a exposição às flutuações diárias e sazonais de temperatura, a passível contaminação por micro-organismos e outras algas, reduzindo a produtividade de biomassa, são algumas desvantagens dessa forma de cultivo, que torna a produtividade inferior (CHISTI, 2007).

3.5.2 Condições de cultivo

O crescimento de uma cultura de microalgas, bem como a produtividade e a composição bioquímica das células, estão relacionados com as condições de cultivo (MORAIS; COSTA, 2008). As microalgas podem ser cultivadas nos modos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, sendo que a diferença entre estas modalidades de cultivo está na fonte de energia e de carbono (RICHMOND, 1986).

O cultivo fototrófico é o mais comumente empregado no crescimento de microalgas. Esta condição ocorre quando as microalgas utilizam a luz (natural ou artificial) como fonte de energia e o carbono inorgânico (dióxido de carbono, por exemplo) como fonte de carbono para formar energia química, produzindo então, através da fotossíntese, suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. No cultivo autotrófico, apesar de sua alta eficiência em utilizar a luz, as microalgas apresentam um crescimento lento devido à limitação de luz em condições de larga escala, quando se alcançam altas densidades de células, ou “fotoinibição” devido à luz excessiva (RAGNI et al., 2008).

O cultivo heterotrófico representa a utilização de composto orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono pelas microalgas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). O crescimento heterotrófico, por outro lado, elimina o requerimento por luz e oferece a possibilidade de aumentar significativamente a concentração celular e a produtividade de biomassa em larga escala (GARCÍA et al., 2000)

No cultivo mixotrófico, as microalgas são capazes de viver em condições fototróficas ou heterotróficas, ou ambas. Nessa forma de cultivo, usam a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO₂ e compostos orgânicos como fonte de carbono (RICHMOND, 1986).

Há pouca informação na literatura sobre a utilização de cultivos mixotrófico e heterotrófico para produção de óleo de microalgas, uma vez que naqueles cultivos são utilizadas fontes de carbono orgânico, o que traz preocupação acerca de uma possível competição pelo uso destas matérias-primas, voltadas também para a alimentação humana (LIANG; SARKANY; CUI, 2009). Porém, uma vantagem significativa do cultivo heterotrófico é o aumento no teor de lipídeo no caso da produção de biomassa microalgal para a geração de biodiesel (GUDIN; THEPENIER, 1986). Se, por um lado, o teor de lipídeos e sua produtividade podem ser aumentados no cultivo heterotrófico, existem evidências de diminuição nos teores de proteína, clorofila e carotenoides ((RICHMOND, 1986).

O cultivo fototrófico é promissor porque as microalgas podem fixar o gás carbônico originado em fábricas, por exemplo, e convertê-lo em óleo, que representa uma forma de mitigação das emissões de gases de efeito estufa, além da diminuição dos custos de produção da biomassa microalgal (LIANG; SARKANY; CUI 2009).

A Tabela 2 demonstra as principais características das formas de cultivo apresentadas anteriormente.

Tabela 2. Características das condições de cultivo.

Condição de cultivo	Fontes de energia	Fontes de Carbono
Fototrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Compostos Orgânicos	Orgânico
Mixotrófico	Luz ou compostos orgânicos	Inorgânico ou orgânico

Fonte: Adaptado de Chen et al. 2011.

3.5.3 Fatores que interferem no crescimento

O crescimento das microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos influenciam diretamente as taxas metabólicas da espécie cultivada (OHSE et al., 2007). Os fatores químicos, estão ligados intrinsecamente ao crescimento das microalgas, influenciando na dinâmica do cultivo, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes, a salinidade e o pH (DERNER et al., 2006; OHSE et al., 2007). Já os fatores físicos, influenciam diretamente o crescimento das microalgas, como por exemplo, a aeração, a luminosidade e a temperatura (OHSE et al., 2007).

3.5.3.1 Temperatura

A temperatura apresenta grande influencia na produção de biomassa, proteínas, lipídeos e compostos fenólicos das microalgas, é influenciada pela temperatura, sendo este, um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos (LOURENÇO, 2006).

Para a preservação de cepas de microalgas em condições laboratoriais onde se deseja preservar cepas de microalgas, é interessante que a temperatura esteja estabilizada em condições que não oscilem mais do que 2°C (ANDERSEN, 2005). Muitas microalgas de água doce podem ser mantidas em laboratório sob temperaturas na faixa de 20°C. Tem-se observado um significativo aumento da produtividade de biomassa e a estabilização do cultivo, quando as temperaturas se mantêm constantes (LOURENÇO, 2006).

De acordo com a temperatura ótima de crescimento, as microalgas podem ser classificadas em três grupos: Microalgas que apresentam faixa térmica ótima abaixo de 17°C são denominadas de psicrófilas, as que possuem faixa ótima entre 20 a 25 °C, mesófilas e as termófilas são as que melhor se desenvolvem em temperaturas até 40 °C (RAS; STEYER; BERNARD 2013).

A temperatura pode influenciar a atividade fotossintética e a respiração. A taxa de respiração aumenta conforme a temperatura (VONSHAK, 1997). A redução da temperatura e o controle de agitação diminuem a velocidade respiratória, principalmente à noite, minimizando perdas na produtividade de biomassa do cultivo (CHISTI, 2007).

3.5.3.2 Iluminação

A luz é fator essencial para que as microalgas possam realizar a fotossíntese e produzirem biomassa. Os cultivos podem ser supridos de luz continuamente ou em ciclos, variando entre um período claro e outro escuro (ANDERSEN, 2005). Para cultivos de microalgas são utilizados fotoperíodo de 10:14 ou 12:12 horas de claro/escuro. Recomenda-se que para estudos fisiológicos, mantenha-se o fotoperíodo, favorecendo a sincronização do cultivo, embora a maioria das espécies cresçam bem com iluminação contínua (SCHMIDT, 2007).

A intensidade da luz, o comprimento de onda e a duração aos quais as células estão expostas, são fatores que influenciam diretamente no crescimento das microalgas (LOURENÇO 2006). Tanto a baixa disposição de luz, como o excesso de iluminação, limitam o crescimento microalgal. Baixas disposições de luz diminuem o crescimento e tendem a aumentar o conteúdo de pigmentos (FÁBREGAS et al., 2001). Em algumas microalgas, a iluminação em excesso pode resultar em estresse foto-oxidativo, bem como, submeter as culturas a altas temperaturas, resultando em um aquecimento localizado (BARBOSA et al., 2003).

Recomenda-se o uso de luz artificial em cultivos de pequena escala, uma vez que a iluminação pode ser controlada de acordo com as necessidades das culturas. As lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia são as mais utilizadas por simular comprimentos de ondas de 350 a 700nm necessários para a fotossíntese. O crescimento, metabolismo, reprodução e morfologia das microalgas cultivadas, são fatores que podem ser afetados pela quantidade de luz fornecida ao cultivo (SILVA et al., 2003).

3.5.3.3 Aeração

A agitação da maioria dos sistemas de cultivo de microalgas ocorre através do borbulhamento de ar. Além de servir como fonte de CO₂, a introdução de ar nos sistemas de cultivo, propicia adequada exposição das microalgas à luz (ANDERSEN, 2005).

Além de evitar a formação de aglomerados celulares, a aeração dos cultivos, garante a incidência luminosa uniforme às células (LOURENÇO, 2006). No entanto, uma agitação em excesso pode comprometer o cultivo, através do choque entre as células (RICHMOND, 2004; ANDERSEN, 2005).

A aeração em sistemas de cultivo fechados (fotobiorreator) é realizado principalmente por bombas mecânicas e ar comprimido (LOURENÇO, 2006; BRENNAN; OWENDE, 2010). Em sistemas abertos, pás giratórias ou sistemas de recirculação de cultura por bombeamento mecânico são os sistemas utilizados.

3.5.3.4 pH

Microalgas de água doce, em geral, preferem ambientes levemente ácidos (pH 5-7), enquanto cianobactérias preferem ambientes levemente alcalinos (pH 7-9). A disponibilidade de vários elementos químicos, depende da faixa de pH, podendo estes cristalizar ou precipitar no cultivo (ANDERSEN, 2005).

A solubilidade de CO₂ e dos minerais, bem como a distribuição das formas inorgânicas de carbono, são fatores afetados pelo pH do meio, influenciando direta e indiretamente no metabolismo das microalgas (ARREDONDO-VEGA; VOLTOLINA, 2007).

O consumo de CO₂ influencia diretamente no crescimento das microalgas. A adição de CO₂ no meio acidifica o meio de cultura, reduzindo o pH (<5) e inibindo o crescimento de algumas espécies. Ao contrario, o consumo de CO₂ do meio, eleva o pH, tornando - o levemente alcalino (> 10) (SCHMIDT, 2007).

3.5.3.5 Nutrientes

As necessidades nutricionais de cada microalga variam entre as espécies e são dependentes das condições ambientais (ABALDE et al., 1995). Os nutrientes necessários para um ótimo crescimento das microalgas são divididos em macronutrientes (C, N, O, H, Ca, Mg, S e K) e micronutrientes (Mn, Mo, Fe, Co, Cu, Zn, Se e B). Os três nutrientes mais importantes para o crescimento autotrófico são o carbono, o nitrogênio e o fósforo, sendo seu fornecimento essencial para o metabolismo microalgal (RICHMOND, 2004). Os diferentes elementos e nutrientes são necessários em concentrações altamente variáveis (LOURENÇO, 2006).

O carbono constitui cerca de 50% da biomassa, sendo um dos principais nutrientes necessários para o crescimento da microalga (LOURENÇO, 2006). O carbono pode estar no meio de cultivo, nas formas de dióxido de carbono (CO₂), ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO³⁻) e carbonato (CO₃²⁻) (OHSE et al., 2007; OLIVEIRA, 2009). O CO₂ é a fonte de carbono preferida pelas microalgas, sendo utilizado diretamente no processo de fixação, uma vez que se difunde rapidamente (difusão passiva) da água para o interior das células (RAVEN, 1988).

O CO₂ é a fonte de carbono para o crescimento fotossintético e autotrófico, das algas, sendo um composto limitante para o crescimento (RICHMOND, 1990).

Segundo Bertoldi (2008), o CO₂ é a fonte de carbono normalmente utilizada e quando empregado acima de 10% pode ocorrer a inibição do crescimento algal.

O carbono e o nitrogênio são os nutrientes mais importantes quantitativamente na nutrição da alga, contribuindo para a formação de proteínas (BECKER, 1994). Os aminoácidos, nucleotídeos e pigmentos, são compostos por nitrogênio, o que justifica a importância deste nutriente no metabolismo celular. Nos meios de cultura, as principais formas de nitrogênio empregadas são sais de nitrato (NaNO₃, HNO₃), sais de amônio (NH₄Cl, (NH₄)₂.SO₄) e ureia (LOURENÇO, 2006).

O fósforo apresentar menos de 1% da composição celular microalgal. Apesar disso, é geralmente um dos mais importantes fatores de limitação do crescimento em cultivos, podendo ser assimilado pelas algas apenas na forma de fosfato (RICHMOND, 2004). O fósforo desempenha um importante papel em muitas biomoléculas, como os ácidos nucléicos, proteínas e fosfolipídios. Tanto na fotossíntese como na respiração, o fósforo é fundamental como componente energético, atuando na transferência de energia através do ATP (RICHMOND, 1990).

O ferro é um nutriente que pode limitar o crescimento das microalgas, sendo que a deficiência deste nutriente no meio de cultivo pode alterar a concentração de clorofila. A suplementação do ferro no cultivo é essencial para o crescimento celular, ocorrendo acréscimo de até 56,6% na quantidade de lipídeos neutros quando comparado ao cultivo sem suplementação de ferro (LIU; WANG; ZHOU, 2008).

Quando determinado nutriente é limitante, sua concentração determinará a produtividade do cultivo (RICHMOND, 2004). Sheehan et al. (1998) reforça que o estresse causado pela deficiência de nutrientes aumenta o acúmulo de lipídios na biomassa, contudo, pode acarretar em um menor crescimento da biomassa microalgal.

3.5.4 Recuperação da biomassa

Para efetuar os processos de extração de pigmentos e produção de biodiesel, há a necessidade de separação da biomassa microalgal do meio de cultivo. O processo de separação envolve normalmente a floculação, centrifugação e filtração (MOLINA et al, 2003). Dependendo das características da microalga em questão, do

tipo de cultivo e do uso da biomassa, será o método escolhido para recuperar a biomassa (GUDIN; THEPENIER, 1986).

Não há um método padrão para a coleta e separação das microalgas. Em escala comercial, a centrifugação pode ser uma escolha viável para separação destas do meio líquido, sendo que a floculação e a flotação podem ser usadas como métodos secundários. A opção mais simples é a sedimentação. Este método pode reter 85% da biomassa, sendo o percentual de biomassa seca por volta de 3%, dependendo da espécie utilizada. No entanto, este processo requer um significativo espaço adicional (FAO, 2009).

Mesmos representando uma significativa elevação dos custos de produção e alta demanda de energia, ainda assim, a centrifugação é o método mais eficiente para separação da biomassa, sendo bastante utilizado quando o produto extraído das microalgas possui alto valor (RYCKEBOSCH; MUYLAERT; FOUBERT 2012).

A coagulação envolve ajuste de pH ou adição de eletrólitos, enquanto a floculação envolve a adição de polímeros catiônicos (SANCHEZA et al., 2011). Outro método alternativo de floculação eficiente é a biofloculação, mediada por bactérias, cujo percentual de recuperação da biomassa pode chegar a 90% (LEE, 2008).

Por fim, entre os processos existentes, a floculação tem sido escolhida como o processo mais vantajoso economicamente para separação da biomassa microalgal do meio de cultivo, devido à menor demanda energética e com vistas à pré-concentração para redução dos custos das etapas subsequentes (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2007). Quando utilizado este método, o efeito da utilização do floculante na composição dos ácidos graxos obtidos do óleo da microalga, também deve ser avaliado (CAMPOS; BARBARINO; LOURENÇO, 2010).

3.6 Cinética de crescimento das microalgas

O meio de cultivo utilizado e as condições do meio externo influenciam diretamente no crescimento das microalgas. De modo geral, no início do cultivo, é adicionado um volume limitado de meio de cultura ao qual é adicionado o inóculo (LEE, SHEN, 2004; RICHMOND, 2004). Ao longo do tempo, os nutrientes se esgotam, tanto pelo metabolismo das microalgas, como pelo fato de não ocorrer entrada ou saída de matéria do meio de cultivo (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

O crescimento populacional das microalgas, assim como de diversos microrganismos, ao longo do tempo é caracterizado por uma curva (Figura 6), que mostra as várias fases características do crescimento (RICHMOND, 2004).

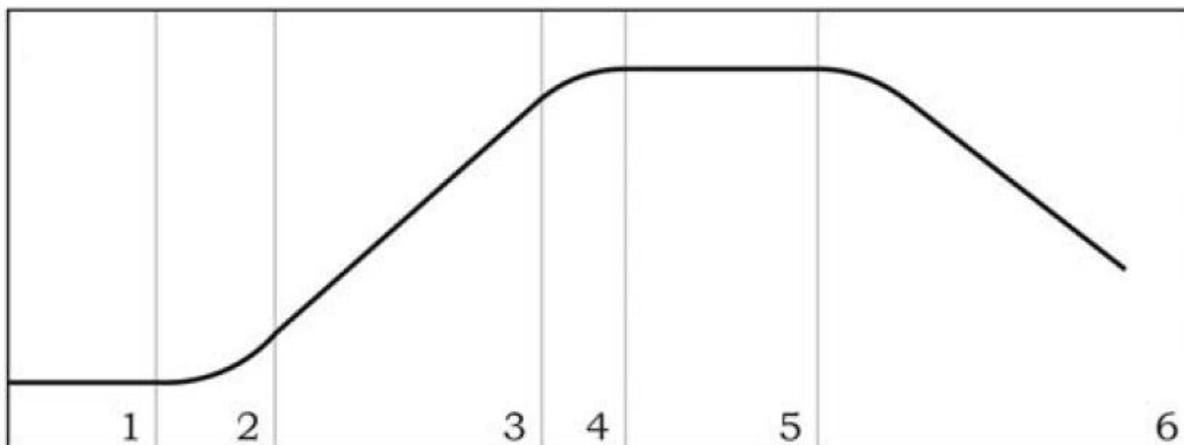


Figura 6. Curva de crescimento de microalgas em cultivos fechados

Fonte: Barsanti, Gualteri, 2006.

Até que ocorra o esgotamento de alguns fatores, a densidade de microalgas aumenta exponencialmente. Um desses fatores poderá ser a concentração de nutrientes que diminuem ao longo do tempo (DORAN, 2005). Uma vez consumidos todos nutrientes, as culturas acabam por morrer, a não ser que sejam fornecidos novamente ao meio de cultivo (ANDERSEN, 2005).

As diferentes fases de crescimento da população de microalgas são as seguintes:

- 1. Fase de adaptação ou lag:** a fase lag ou fase de adaptação corresponde à fase de adaptação fisiológica às condições do novo meio de cultura, devido a possíveis alterações de nutrientes, salinidade, luminosidade, irradiação, entre outros (ANDERSEN, 2005). Trata-se de um período de adaptação das células extraídas de uma cultura em fase exponencial ou estacionária para um meio fresco, ocorrendo pouco aumento da densidade celular. O atraso no crescimento é atribuído à adaptação fisiológica do metabolismo celular da microalga, como o aumento das concentrações de enzimas e metabólitos envolvidos na divisão celular e na fixação de carbono (COUTTEAU, 1996).

- 2. Fase de aceleração de crescimento:** a fase intermédia entre a fase lag e a fase exponencial é a fase de aceleração de crescimento. Nesta fase a adaptação da microalga já se encontra completa (BARSANTI, GUALTIERI, 2006).
- 3. Fase exponencial ou log:** após a adaptação ao meio, as microalgas começam a crescer e a multiplicar-se, atingindo a fase máxima de multiplicação celular e de crescimento exponencial do número de células (ANDERSEN, 2005). A chave para o sucesso da produção de algas é manter as culturas nesta fase de crescimento. A taxa de crescimento específico é dependente da espécie de microalga, da intensidade de luz e da temperatura. (COUTTEAU, 1996). As microalgas multiplicam-se até que exista a saturação de minerais e luz solar. Geralmente as culturas de microalgas em fase exponencial contêm mais proteína, enquanto as culturas em fase estacionária possuem mais carboidratos e glicogénio (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).
- 4. Fase de desaceleração do crescimento:** a taxa de crescimento celular começa a diminuir, podendo ocorrer em consequência da diminuição da quantidade de luz que chega às células, à diminuição de nutrientes, à alteração de pH, ao déficit de CO₂ (RICHMOND, 2004).
- 5. Fase estacionária:** após a fase de desaceleração a população de microalgas continua a aumentar (GROBBELAAR, 2004; RICHMOND, 2004). No entanto, a taxa de crescimento começa a diminuir até atingir o zero, altura em que a cultura entra na fase estacionária. À custa da utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido à lise de outras células, a população mantém, durante algum tempo, uma concentração aproximadamente constante de biomassa (COUTTEAU, 1996).
- 6. Fase de morte:** a fase final da cultura é caracterizada por uma taxa de crescimento negativa, resultante do esgotamento de nutrientes da cultura. A densidade celular decresce rapidamente e a cultura eventualmente entra em colapso (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Nem sempre é possível acompanhar claramente cada fase do crescimento, pois algumas partes da curva podem ser alteradas de acordo com cada cultura ou por influência de diversos fatores que afetam o metabolismo e desenvolvimento da população microalgal (BECKER, 1994).

3.7 Nitrogênio e cultivo das microalgas

Os nutrientes presentes no meio de cultivo afetam diretamente a quantidade de lipídeos presentes na célula. A proporção de nitrogênio pode variar de 1 a 10% do peso seco da célula. Esta variação é observada tanto entre diferentes grupos de microalgas, como em diferentes populações de uma mesma espécie, dependendo do fornecimento e disponibilidade deste nutriente (RICHMOND, 2004).

O nitrogênio é o nutriente que afeta de forma mais crítica a biossíntese, armazenamento e composição dos lipídeos. O metabolismo de várias algas é influenciado por este nutriente, influenciando na concentração de lipídeos e ácidos graxos. A insuficiência do nitrogênio leva a um acúmulo de lipídeos nas microalgas, geralmente por estresse fisiológico. Alguns estudos envolvendo algas revelaram que o acúmulo de lipídeos e ácidos graxos são influenciados pela quantidade de nitrogênio do meio de cultivo (PIORRECK; BAASCH; POHL1984).

Estudos mostraram que em culturas onde o nitrogênio é um fator limitante, a porcentagem de lipídeos em relação à massa total aumenta consideravelmente (HU et al., 2008). Em seus estudos, Piorreck et al. (1984) constataram que em baixas concentrações de nitrogênio, as algas verdes apresentam grandes contrações de lipídeos totais (44-66% do peso seco).

Um fator essencial na preparação do meio de cultura para muitas algas é a forma em que o nitrogênio é fornecido. Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), essa resposta às condições de estresse por deficiência nutricional é particular de cada espécie, sendo que a alteração na composição dos ácidos graxos e no teor de lipídeos das microalgas pode ocorrer de forma negativa ou positiva.

Quando a fonte de nitrogênio apresenta-se na forma de nitrato, a microalga realiza gastos celulares energéticos para reduzir esse íon a nitrito, posteriormente, ocorre outra redução gerando a amônia (forma de nitrogênio utilizada pela alga em seu metabolismo) (BERTOLDI, 2008).

A carência de nitrato pode desencadear a acumulação de lipídeos, nomeadamente os triacilgliceróis (TAG), adequados para a produção de biodiesel. (PRUVOST et al., 2011). Amaro et al. (2011) referem que a produtividade e o teor lipídico estão correlacionados inversamente e, em situações de *stress*, como a privação de nitrogênio, o crescimento das células é limitado, aumentando por outro lado o teor de lipídeos. Quando não há nitrogênio suficiente para a biossíntese das proteínas necessárias para o crescimento, o carbono em excesso proveniente da fotossíntese é canalizado para as moléculas de armazenamento, como os triacilgliceróis, aumentando a taxa lipídeos (RAMOS et al., 2009).

3.8 Lipídeos e composição celular das microalgas

Os lipídeos são substâncias químicas que caracterizam-se pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos apolares e baixa solubilidade em água (NELSON; COX, 2011). As funções dos lipídios nos organismos vivos são tão diversas quanto à sua composição química. De modo geral, dentre todas as funções destas substâncias, a função energética e estrutural se destacam. Energeticamente, os lipídeos tem função de armazenar energia, na forma de gordura e ácidos graxos. Estruturalmente os lipídeos participam da composição das membranas celulares, através dos fosfolipídios (RAMOS et al., 2009).

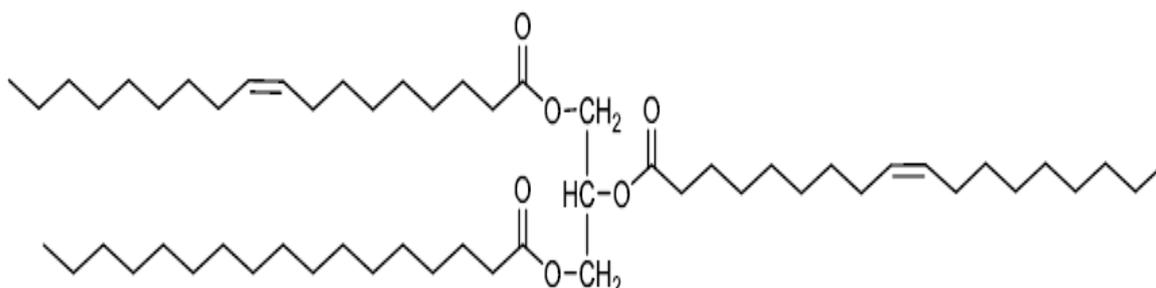
De acordo com a natureza do ácido e do álcool que os formam, os lipídeos podem ser classificados em três grupos: lipídeos simples, compostos e derivados. (FAHY et al., 2005).

Os lipídeos simples são ésteres de ácidos graxos com algum tipo de álcool, podendo ser glicerídeos (ésteres de glicerol, que são os óleos e as gorduras) ou cerídeos (ésteres de alcoóis acíclicos superiores, que são as ceras). Os lipídeos compostos apresentam além dos elementos contidos nos lipídeos simples (C, H e O), átomos de nitrogênio e fósforo. Dividem-se em fosfolipídeos (ésteres de ácidos graxos, ácido fosfórico e álcool) e glicolipídeos (ésteres de ácidos graxos, Carboidrato e álcool); e por fim, os lipídeos derivados, são obtidos por hidrólise de lipídeos simples e compostos, incluindo substâncias como ácidos graxos, alcoóis, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis, pigmentos e compostos nitrogenados (FAHY et al., 2005).

Quanto ao tipo de ligação entre os átomos de carbono da molécula, os ácidos graxos podem ser tanto saturados, quanto insaturados. No geral, os ácidos graxos predominantes são os insaturados, como o palmítoleico (C16:1), oléico (C18:1), linolêico (C18:2) e linolênico (C18:3). Mas também, ocorre a produção de ácidos graxos saturados, correspondendo a uma quantidade de 13,6-58,9% da soma de todos os ácidos graxos. Entres os ácidos graxos saturados ocorre uma predominância do palmítico (C16:0), ácido mirístico (C14:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido láurico (C12:0) (MATA et al., 2010).

Os lipídios também podem ser classificados como polares e apolares. Os lipídios apolares compreendem os mono-, di- e triacilgliceróis. Os polares são representados pelos fosfolipídios e glicolipídios, e estão associados à formação estrutural e à funcionalidade das membranas celulares (BRIAN, 2011).

Para a produção de biodiesel, os lipídios que mais interessam são os de armazenamento, como, por exemplo, os triacilgliceróis (Figura 7), também



conhecidos como gorduras ou gorduras neutras. Os ácidos graxos são as principais moléculas de construção destes tipos de lipídios. Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos e suas quantidades determinam as propriedades físicas da molécula no geral. Além da quantidade de cada ácido graxo, o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações determinam as características físicas (RAMOS et al., 2009).

Figura 7. Molécula de triacilglicerol

Fonte: Ramos et al., 2009.

Os ácidos graxos que compõe os triacilgliceróis influenciam diretamente nas propriedades do biodiesel produzido a partir destes, tais como: a viscosidade cinemática, a massa específica, o ponto de entupimento de filtro a frio e a estabili-

dade oxidativa. Para tanto, a avaliação dos triacilgliceróis para produção deste biocombustível é de fundamental importância (HU et al., 2008).

O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004). Cada espécie ou linhagem de microalga, apresenta capacidade específica de produção de óleo em grandes quantidades (HU et al., 2008). Se a microalga contem características favoráveis às condições ambientais do local de cultivo e um bom crescimento em pouco tempo de cultivo, apresentará ótimas condições para produzir em sua célula uma alta quantidade de lipídios (MATA et al., 2010).

Os diferentes tipos de lipídeos produzidos pelas microalgas contem entre 12 e 22 carbonos e são tipicamente compostos por glicerol, açúcares e ácidos graxos, em sua maioria insaturados, apresentando em menor proporção a presença dos ácidos graxos saturados (KHAN et al., 2009). Em algumas espécies, os ácidos graxos polinsaturados representam entre 25 e 60% dos lipídeos totais (RADMANN; COSTA, 2008). A expressiva quantidade de instauração dos ácidos graxos presentes em algumas espécies de microalgas, facilita a oxidação do biodiesel durante seu armazenamento, limitando a utilização das mesmas como matéria prima para produção deste biocombustível (BRENNAN; OWENDE, 2010).

O extrato lipídico das microalgas é composto de três classes de lipídios: lipídio total, lipídio bruto e lipídio neutro. A fração lipídica total inclui pigmentos, fosfolipídios, glicolipídios, além dos lipídios neutros, a fração lipídica bruta contém todos os lipídios neutros e pigmentos e a fração lipídica neutra inclui os triacilglicerídeos, os ácidos graxos livres, os hidrocarbonetos, os esteróis, os ésteres de esteróis e os álcoois livres (BRIAN et al., 2011).

As microalgas produzem mais óleo do que alguns vegetais oleaginosos. O conteúdo de lipídios excede a maioria das plantas terrestres e pode ser considerado como um substituto potencial para os produtos do óleo de origem fóssil (OIL PRODUCTION, 2008). A Tabela 3 mostra o rendimento da extração de óleo de diversas oleaginosas e microalgas.

Tabela 3. Rendimento da extração de óleo em diferentes espécies de oleaginosas.

Rendimento de óleo t/ha x ano	
Mamona	0,5-1,0
Soja	0,2-0,6
Girassol	0,5-1,5
Canola	0,5-0,9
Pinhão manso	2,0-3,0
Óleo de palma (dendê)	3,0-6,0
Microalgas	50-100

Fonte: Pequeno et al, 2012.

Algumas espécies de microalgas, mesmo apresentando reduzido teor de óleo em sua biomassa, são capazes de produzir 58.700 L ha⁻¹ ano⁻¹ de óleo, valor significativamente superior, quando comparado à cultura de milho (172 L ha⁻¹ ano⁻¹), soja (636 L ha⁻¹ ano⁻¹), canola (974 L ha⁻¹ ano⁻¹) ou mesmo palma (5.366 L ha⁻¹ ano⁻¹) (CHISTI, 2007).

Comparando-se com as plantas superiores, a variação da composição química em ácidos graxos nas microalgas é muito grande, até mesmo quando se observa esta característica dentro e entre os grupos taxonômicos. A composição química do óleo presente na matéria prima utilizada na produção do biodiesel, influencia diretamente em sua escolha para tal processo (COBELAS; LECHADO, 1989). Sendo assim, a produção de ácido graxo, tanto podem ser os poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs), tais como C20:4; C20:5; C22:5; C22:6, quanto os ácidos graxos de 16 e 18 carbonos com cadeias saturadas ou com diferentes padrões de monoinsaturação, C16:0; C16:1; C18:1 (BOROWIZTKA, 1998).

O óleo de microalgas, se enquadra dentro das principais características exigidas pela ANP (Agencia Nacional de Petróleo) para qualidade do biodiesel, como o ponto de fulgor mínimo de 115°C e baixo índice de acidez (menor que 0,8 mg KOH/g) (TEIXEIRA, 2006).

A composição da microalga varia conforme a fase de crescimento e a espécie. Além do conteúdo lipídico, as microalgas apresentam em resposta a diferentes condições de iluminações, diferentes proporções de pigmentos. Cada pigmento presente na composição das microalgas apresenta diferentes espectros de absorção, específicos para cada um dos mesmos (BOROWIZTKA, 1998).

As clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas, são os principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal (ABALDE et al., 1995).

As ficobilinas são classificadas como proteínas e as demais, do grupo dos lipídeos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Os carotenóides, são pigmentos que apresentar cor amarela, laranja, vermelha ou marrom. Atuam como pigmentos fotossintéticos secundários, aumentam a captação de luz de fotossistemas e protegem o fotossistema do excesso de luz, funcionando também, como fotoprotetores (LOURENÇO, 2006). Dentre aproximadamente 60 tipos diferentes de carotenoides, as microalgas podem conter entre 5 e 10 tipos em suas células (BAKER; GUNTER, 2004).

Praticamente os únicos pigmentos naturais verdes utilizados nos processos fotossintéticos, são as clorofilas. Com estrutura complexa, as clorofilas apresentam caráter hidrofóbico e alto grau de instauração. As clorofilas são classificadas de acordo com sua estrutura molecular e pela capacidade de absorção luminosa, em cinco classes que podem ser encontradas naturalmente em algas: clorofilas *a*, *b*, *c*, *d* e (ANDRADE et al., 2014).

Segundo Streit et al, (2005), independente da classificação das microalgas, a clorofila *a* é a mais abundante, atuando como agente catalítico no primeiro estágio do processo de fotossíntese na fase fotoquímica.

Outras clorofilas são consideradas pigmentos acessórios, e auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia para os centros de reação. A clorofila *c* é considerada como um intermediário na transferência de energia entre carotenóides e clorofila (FALKOWSKI; RAVEN, 1997).

Dentre os processos de extração de pigmentos conhecidos, não há um único método eficiente, pois a estabilidade da extração depende da espécie da microalga. HERRERO e colaboradores (2005) extraíram antioxidantes por solventes GRAS (considerados seguros) em amostra seca da microalga *Spirulina platensis* e concluíram que o etanol mostrou melhor performance em comparação ao hexano e ao éter de petróleo.

As microalgas produzem carboidratos que, na sua maioria, são produtos de reserva (amido, crisolaminarina e paramido) ou atuam no equilíbrio osmótico, e por possuírem alto valor calórico, constitui valiosa fonte energética aos consumidores (VALENZUELA-ESPINOZA; MILLÁN-NÚÑEZ; NÚÑEZ-CEBRERO 2002). A composição de carboidratos pode apresentar diferença na fase exponencial e na

fase estacionária, sendo estas específicas a cada espécie. Nestas fases, podem ser encontrados carboidratos na forma de amido, glicose e polissacarídeos, não limitando o uso da microalga em alimentos (HARUN et al., 2009).

As microalgas podem possuir quantitativos semelhantes de proteínas às das sementes de leguminosas, que caracterizam-se por apresentar alto teor protéico (12 a 35%), sendo que alguma que, algumas variedades de soja alcançando de 40 a 50% de proteína na semente (NEVES; SILVA; LOURENÇO, 2004). As condições de cultivo, de modo geral, não influenciam na qualidade da proteína das microalgas e estas apresentam a mesma composição de aminoácidos, independente do aumento da intensidade luminosa fornecida aos sistemas de cultivo ou das diferentes fases de crescimento das microalgas (BROWN; JEFFREY; VOLKMAN, 1997).

Valenzuela e colaboradores (2002), relatam que o teor de proteínas é maior na fase exponencial e de carboidratos na fase estacionária quando as células já estão envelhecidas.

3.9 Extração do óleo de microalgas

A extração de óleos vegetais teve início com o linho e o algodão no antigo Egito (10.000 a.C). Algum tempo depois, novas técnicas que resultassem num melhor rendimento na extração de óleos foram desenvolvidas e em 1877 foi utilizada a primeira prensa hidráulica (MA; HANNA, 1999).

Estudos têm sido realizados, com o objetivo de identificar microalgas adequadas para a produção de biodiesel e para isso concentram seus trabalhos, além do cultivo, da colheita e separação das microalgas, nos processos de extração e caracterização da fração lipídica extraída (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2010).

Existem atualmente, diferentes formas de extração do óleo de microalgas, utilizando diversos tipos de solventes, possibilitando assim, um aperfeiçoamento das metodologias de extração e por fim, obter uma quantidade de óleo maior, com um custo cada vez menor (CARVALHO; MALCATA, 2005).

Os requisitos para que um método de extração seja eficiente, é que este seja rápido e termolábil, a fim de reduzir a degradação dos lipídeos e triacilgliceróis (MOLINA et al., 2003). Na extração os solventes devem ser baratos, voláteis, de baixa toxicidade, puros, imiscíveis em água e seletivos, ou seja, que não extraiam

compostos indesejáveis, contaminando o óleo obtido (MOLINA et al., 2003). Diante deste contexto, o método de extração de lipídeos da biomassa microalgal, deve ser específico e ter a maior seletividade possível, a fim de minimizar a extração das frações não lipídicas e maximizar as frações desejadas (MENDIOLA et al., 2007).

A extração dos lipídeos de microalgas é normalmente realizada por processos como: extração por ultrassom, micro-ondas, prensagem mecânica, homogeneização, extração com solvente, extração com fluido supercrítico, extrações enzimática, e choque osmótico (CHISTI, 2008).

O emprego de extração assistida por ultrassom ou micro-ondas, tem por objetivo a máxima remoção dos lipídeos da biomassa (LATALA, 1991). As ondas são aplicadas para que ocorra o rompimento das células, promovendo assim, um maior contato do conteúdo interno com o solvente extrator. Quando deseja-se extrair compostos com baixo peso molecular, o método mais utilizado é a ultrassom. Este método apresenta um eficiente rendimento do óleo, utilizando-se demanda energética menor quando comparado com outras técnicas de extração (MENG, 2009).

Outra vantagem da utilização do ultrassom é a redução do tempo de extração, reduzindo o volume de solvente necessário no processo, minimizando possíveis danos ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As microondas, que quebram as células usando o choque de ondas de alta frequência, foram sugeridas recentemente como uma técnica para extração de óleos vegetais (VIROT et al., 2008). A ultrassonicação parece ser um dos métodos mais comuns para assegurar acesso livre aos solventes e a subsequente extração dos lipídeos, pois racha a parede e a membrana da célula, permitindo uma melhor penetração do solvente no interior da mesma (CRAVOTTO, 2008).

As técnicas de extração por prensagem mecânica e homogeneização, envolvem o uso de pressões para romper as paredes celulares, extraindo o conteúdo lipídico interno (GREENWELL et al., 2010). A extração utilizando o processo de prensagem é uma das opções mais simples. Neste processo, é utilizada uma prensa que extrai uma grande porcentagem de óleo, através da compressão das microalgas contidas em um determinado volume de biomassa (PÉREZ, 2007).

A extração mecânica, mantém a integridade química da substância originalmente contida dentro das células, minimizando a contaminação da biomassa de microalgas a partir de fontes externas. Este método é geralmente utilizado em

combinação com solventes, o que pode facilitar o processo de separação do óleo extraído da biomassa. Normalmente, este tipo de rompimento celular se torna mais eficiente quando a concentração de biomassa está em torno de 100 a 200 gL⁻¹ (GREENWELL et al., 2010).

A extração com fluido supercrítico ganhou aceitação nos últimos anos, tendo reconhecida a sua alta seletividade, solucionando o maior problema relativo à extração com solventes orgânicos que caracteriza-se pela dificuldade de remoção total dos resíduos de solventes presentes nos extratos (MENDIOLA et al., 2007).

Este método pode extrair quase 100% de todo o óleo, no entanto, necessita de um equipamento especial para o confinamento e a aplicação de pressão, para que o extrato obtido seja altamente purificado e livre dos resíduos de solventes (SAHENA et al., 2009). Na extração por fluido supercrítico, utiliza-se o CO₂. O gás é submetido à pressão até que se liquefaça, em seguida é aquecido ao seu ponto supercrítico, onde apresenta propriedades tanto de líquidos, quanto de gás. Este fluido atua como solvente, realizando a extração do óleo (FIORENTINI et al., 2006).

Para a eficiência do método supercrítico, quatro fatores fundamentais: pressão, temperatura, tempo de extração e a vazão do solvente. O uso de co-solvente é um fator interessante se tratando de extração com fluidos supercríticos e/ou gases pressurizados. Quando o etanol é utilizado como co-solvente, a polaridade do meio pode aumentar propiciando um aumento no rendimento e/ou seletividade da extração (MENDIOLA et al., 2007).

A extração enzimática também provoca o rompimento da parede celular, através da hidrólise para liberação do óleo. Esta técnica fornece resultados promissores quando aplicada simultaneamente com processos puramente mecânicos, aumentando o rendimento na obtenção de óleo (GOMES, 2016).

O método de choque osmótico é um procedimento de extração onde ocorre uma redução repentina na pressão osmótica, levando a ruptura das paredes das células das microalgas em solução, liberando componentes celulares, tais como o óleo. No entanto, o uso de solvente, como uma etapa posterior ao choque osmótico, resulta em uma melhor extração do óleo (MENDIOLA et al., 2007).

No método de extração por solvente o óleo é extraído da biomassa por repetição de lavagem ou percolação com um solvente orgânico, podendo ser realizada isoladamente ou em conjunto com outros métodos, buscando, assim, um maior rendimento do óleo (PÉREZ, 2007).

Brum e colaboradores (2009) definiram a extração de óleo com solvente, como um processo de transferência de constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a matriz graxa) para um solvente com o qual a matriz se acha em contato. Os solventes orgânicos são muitos utilizados na extração do óleo das microalgas, mas devido O rendimento do óleo depende do tipo de solventes utilizados, levando em consideração o potencial antioxidante e a polaridade dos compostos. Dentre todos os tipos de solventes, os orgânicos, são os mais utilizados na extração do óleo de microalga (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011). Os solventes mais utilizados são o hexano, o etanol, o clorofórmio e o éter dimetílico (MOLINA et al., 2003; D'OCA et al., 2011).

Devido as diferenças morfológicas e fisiológicas entre as espécies de microalgas, obter informações sobre os solventes que serão utilizados é indispensável para o sucesso da extração. Há solventes que não conseguem romper totalmente a parede celular da microalga, e com isso obtêm-se um menor rendimento de óleo (PÉREZ, 2007).

Para que a extração seja eficaz, se faz necessário que o solvente penetre totalmente a biomassa e entre em contato com a substância que se deseja extrair. O etanol, por exemplo, é um bom solvente polar, que age enfraquecendo as ligações de hidrogênio, obtendo-se lipídeos polares. No entanto, o etanol acaba extraíndo algumas substâncias não desejáveis, como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

Folch; Lees; Stanley (1957) desenvolveram uma metodologia para extração de lipídeos, utilizando clorofórmio/metanol (2:1 v/v), seguida pela adição de solução de cloreto de potássio, com o objetivo de promover uma melhor separação das fases obtidas na reação.

Métodos gravimétricos, comumente empregados para determinação do teor de lipídeos totais, são baseados na extração com hexano em *Soxhlet* ou no método de Bligh e Dyer (1959). Quando o solvente utilizado é o hexano, pode-se fazer uso do equipamento de *Soxhlet*, que apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos, pois, o solvente fica em constante contato com a amostra, podendo ser constantemente renovado, sem que haja procedimento posterior para obtenção do óleo (MIAO; WU, 2006).

Bligh e Dyer modificaram o método Folch, utilizando clorofórmio: metanol:água (2:1:0,8 v/v), propondo um método rápido para extração e purificação

de lipídeos totais. Este método é bastante estudado e conhecido pelos pesquisadores, com objetivo de determinar os lipídeos totais, que compreendem ácidos graxos, hidrocarbonetos, esteroides, acilgliceróis, pigmentos e os glico- e fosfolipídeos. Após obter o óleo pelo método Bligh e Dyer, obtém-se os lipídeos neutros, que são a fração conversível em biodiesel, através da redissolução dos lipídeos totais em hexano ou outro solvente qualquer que atue como esterificante. Após a eliminação do solvente por evaporação, a massa dos lipídeos neutros é então determinada (FOLCH et al. 1956).

Tanto o método de Folch et al. (1956) como o de Bligh e Dyer (1959), apesar de eficientes nos processo de extração, apresentam algumas desvantagens, como a toxicidade dos solventes usados e a possível extração de substâncias não desejáveis da fase orgânica. Ambos os métodos são largamente utilizados, tanto como propostos originalmente, quanto modificados (OH; LEE; YOON, 1998).

Uma das principais limitações para produção de produtos de baixo custo e co-produtos, como por exemplo, combustíveis e alimentos, é o processo de extração, que apresenta todas as características e particularidades citadas anteriormente (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011).

3.10 Biodiesel de microalgas

As primeiras pesquisas com microalgas para a produção de biocombustível ocorreram em 1950 no *MIT (Massachusetts Institute of Technology)*, a partir de então, os estudos vêm sendo aprimorados no intuito de aperfeiçoar os processos. O uso de microalgas para a produção de biodiesel também é uma aplicação de grande interesse devido a sua alta taxa fotossintética, quando comparada as plantas terrestres (ARESTA; DIBENEDETTO, A.; BARBERIO, 2005). Pesquisas estão sendo desenvolvidas para utilização de microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel com o objetivo de avaliar as variáveis que influenciam no rendimento e na qualidade do produto, assim como nos custos do processo (OH; LEE; YOON, 1998).

Para a biomassa de microalga ser economicamente viável como matéria-prima para a produção do biodiesel em relação às culturas tradicionais é necessário aumentar a produtividade da biomassa e o teor de lipídeos e reduzir os custos dos insumos utilizados no preparo do meio de cultivo (GRIMA et al., 2003).

As microalgas têm grande potencial para a produção do biodiesel, pois apresentam uniformidade do organismo, ao contrário das plantas que apresentam folhas, caule, frutos e raízes que deverão ser separados antes da extração dos ácidos graxos (HUNDT; REDDY, 2011).

Para o biodiesel produzido, a partir de microalgas, ser aceito tanto no mercado nacional quanto nos mercados internacionais, as suas propriedades físico-químicas devem estar dentro dos padrões nacionais, definidos pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP (ANP 07/2008). O biodiesel obtido a partir da biomassa de microalgas possui características físicas e químicas semelhantes às do biodiesel obtido a partir das biomassas tradicionais (soja, pinhão-manso, babaçu, óleo residual, etc.), por possuir lipídeos com características semelhantes (MIAO; WU, 2006).

A produção de biodiesel de óleo de microalgas, ocorre a priori, por transesterificação catalisada, dependendo das características físico-químicas do óleo, por bases ou ácidos ou enzimas, usando catalisadores homogêneos ou heterogêneos (MOHEIMANI, 2005). Este processo é o mais economicamente viável e de maior eficiência entre os três apresentados, tendo em vista a composição dos principais óleos utilizados para produção de biodiesel (HAERTEL, 2009).

Outras alternativas podem ser a esterificação, esterificação seguida de transesterificação, hidroesterificação ou, ainda, a realização da extração do óleo e transesterificação direta, também conhecida como transesterificação *in situ*. Além de simplificar o processo de produção, os resultados de transesterificação direta melhoram os rendimentos em ésteres alquílicos, quando comparados a uma extração convencional (LEWIS; NICHOLSB; MCMEEKINA, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo da microalga

O cultivo da microalga foi realizado no Laboratório de Botânica da Faculdade de Ensino Superior de São Miguel do Iguçu – PR. A cepa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) foi fornecida pelo laboratório de Limnologia, Ecotecnologia e Biomanipulação da Universidade Estadual de Oeste do Paraná – UNIOESTE. A microalga utilizada no estudo é um estirpe que foi isolada no próprio laboratório, por isso é caracterizada como uma cepa selvagem.

Os experimentos foram realizados em triplicatas, conduzidos em biorreatores de vidro com capacidade de 3000 mL de volume, contendo 2000 mL de cultura contando com um sistema de arejamento e agitação, através de compressores de ar tipo A320/A420. A temperatura do ambiente foi de 25° C e fotoperíodo de 24 horas, fornecido por quatro lâmpadas fluorescentes tubular de 20 W, totalizando uma iluminância de 5000 Lux.

O preparo dos inóculos da microalga foi realizado em duas condições: com (CN) e sem nitrogênio (SN) no meio de cultivo. O meio de cultivo utilizado foi o TAP (HARRIS, 1989), com os macronutrientes e micronutrientes nutrientes apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Solução de sais.

Reagente	Quantidade (g.L)
NH ₄ Cl	15,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	4,0
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,0

Fonte: Autor, 2016

Tabela 5. Solução de fosfatos.

Reagente	Quantidade (g.L)
K ₂ HPO ₄	28,8
KH ₂ PO ₄	14,4

Fonte: Autor, 2016

Tabela 6. Solução elemento traço.

Reagente	Quantidade (g.L)
EDTA	50
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	22
H ₃ BO ₃	11,4
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	5,06
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	1,61
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1,57
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	1,10
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	4,99

Fonte: Autor, 2016

No cultivo sem nitrogênio (SN) os nutrientes nitrogenados (NH₄Cl e (NH₄)₆Mo₇O₂₄) foram suprimidos. Os cultivos foram executados, contendo 2 L de água, 10 mL de solução de Sal, 4 mL da solução de fosfatos e 2 mL de Elemento traço e por fim 5 mL do inóculo.

Os cultivos foram alimentados com as soluções a cada 7 dias. A Figura 8 demonstra o cultivo da microalga.

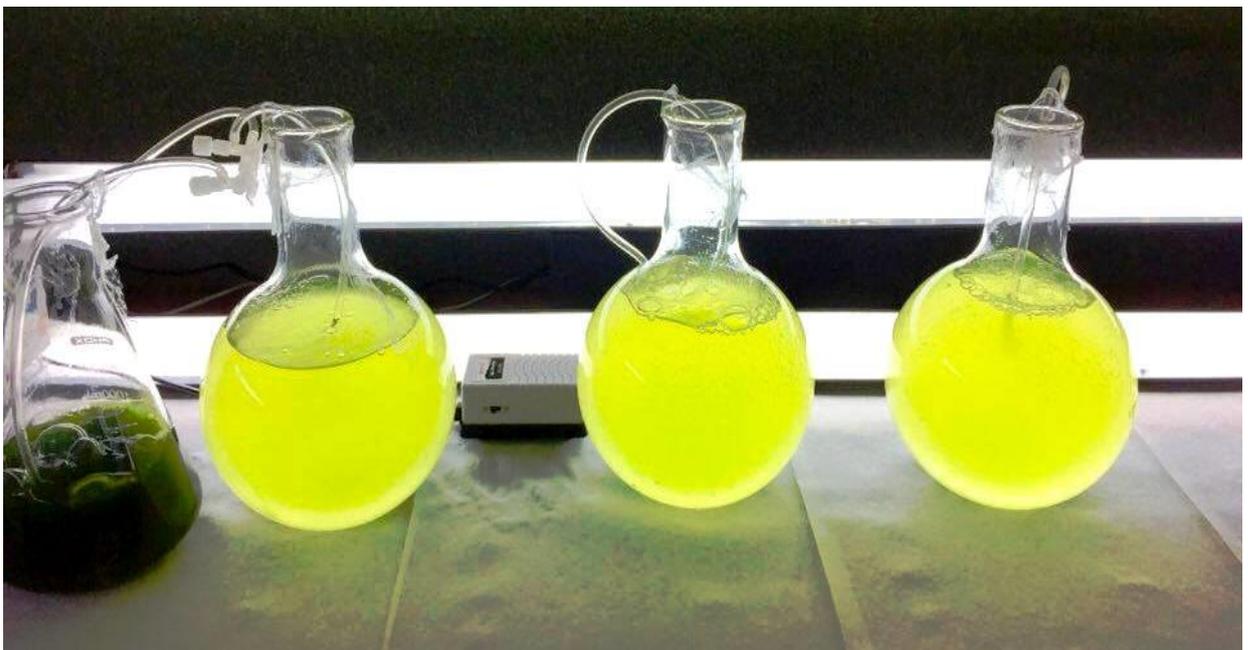


Figura 8. Cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Fonte: Autor, 2016.

4.2 Cinética de crescimento

O aumento da biomassa e/ou densidade celular nos cultivos foi monitorado diariamente, pela concentração celular, utilizando-se uma correlação pré-determinada (curva-padrão) entre a massa seca da biomassa, pela absorbância a 670 nm, determinada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-vis 1203 e, também, por turbidez, utilizando-se um turbidímetro - modelo AP 2000P.

Para obter a curva de crescimento celular, foram realizadas medidas diárias da turbidez de ambos os cultivos, obtendo-se a biomassa em função dos dias para cada meio.

A produtividade (P em $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) da biomassa é dada por:

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)} \quad (\text{Equação 1})$$

sendo que: X_t é a densidade celular no tempo t em (g.L^{-1})

X_0 é a densidade celular no tempo t_0 em (g.L^{-1})

t é o tempo (dia).

4.3 Recuperação da biomassa

A recuperação da biomassa do cultivo foi realizada no 14º dia de cultivo pela adição de 5 mL de uma solução na concentração de 5 g/L de floculante catiônico (Tanfloc-SL) por litro de cultivo de alga, para que a biomassa decantasse.

Após a decantação a biomassa foi filtrada em telas de 20 mesh, e então recolhida e colocada em estufa para a secagem, na temperatura de 60° C, por 24 horas (BECKER, 1994; SPECTOR et al., 2008; D'OCA et al., 2008; MIAO e WU, 2006). De acordo com os dados da literatura, temperaturas em torno de 60° C mantém a composição de lipídios na biomassa algácea (WIDJAJA et al., 2009).

Depois de seca, a biomassa foi triturada e armazenada em potes plásticos a temperatura de -8 °C (em freezer), com o objetivo de manter, desta maneira, as propriedades da biomassa (MOLINA GRIMA et al., 2003; WIDJAJA et al.; 2009).

4.4 Teor de clorofila *a* e *b*

A concentração de clorofilas *a* e *b* foi estimada por método colorimétrico, por meio da substituição dos valores de absorbâncias das amostras lidas em diferentes comprimentos de ondas, conforme as equações 2, 3 e 4, propostas por Becker (1994).

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (16,5 \times A665) - (2,69 \times A650) \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (33,8 \times A650) - (12,5 \times A665) \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Clorofila } a + b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (4,0 \times A665) + (25,5 \times A650) \quad (\text{Equação 4})$$

Para a realização das leituras de absorbâncias, cerca de 10 mg de biomassa seca, proveniente do cultivo com e sem nitrogênio, foram suspendidas em 3 ml de metanol em tubos do tipo Falcon (15 mL) e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho-maria, a 90° C por 5 minutos.

Após este período, o volume da solução foi completada, adicionando-se mais 4 mL de metanol e as amostras foram submetidas às leituras em espectrofotômetro (Thermo Scientific, mod. Genesys 10S UV-VIS) nos respectivos comprimentos de onda, conforme a equação para avaliação do teor de clorofila.

4.5 Determinação das proteínas totais

As proteínas da biomassa proveniente de ambos os cultivos (com e sem nitrogênio) foram determinadas por análises em triplicatas, de acordo com a metodologia proposta pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos – LQA, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo.

Para tanto, 100 mg de biomassa foram adicionadas em um tubo de ensaio com bordas e esta suspendida com 5 mL da solução digestora. Em seguida o tubo foi levado ao bloco digestor a 50° C, aumentando a temperatura do mesmo até que atingir 450° C.

Constatou-se que houve digestão completa da amostra, quando a mesma adquiriu cor esverdeada, sem presença de grumos no tubo.

Na sequencia foram adicionados nos tubos cerca de 15 mL de água destilada. A destilação foi realizada acoplado-se o tubo de ensaio com a amostra digerida no equipamento destilador. A destilação foi finalizada quando o erlenmayer completou 75 mL da solução destilada.

A titulação da amostra foi realizada com ácido sulfúrico (0,02 M), anotando-se o volume de ácido gasto no procedimento.

O cálculo das proteínas totais foi realizado de acordo com a equação 5:

$$\% \text{ de N} = \frac{V \times N \times \text{Fator do ácido} \times 14 \times 100}{P \text{ amostra (mg)}} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

V = volume ácido gasto

N = normalidade do ácido

P amostra = peso amostra

$$\% \text{ de Proteína Bruta} = \% \text{ de N} \times 6,25$$

4.6 Determinação de matéria seca, mineral e umidade

A determinação da matéria seca e das cinzas, proveniente de ambos os cultivos (com e sem nitrogênio) foram realizadas por análises em triplicatas, de acordo com a metodologia proposta pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos – LQA, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo.

Para determinar a matéria seca, cadinhos (250 mL) foram levados a estufa por 2 horas na temperatura de 105° C. Passado este tempo, os cadinhos foram deixados no dessecador até esfriarem, para posterior pesagem dos mesmos. Em seguida 2,000 g de biomassa foram adicionados aos cadinhos e posteriormente estes foram levados para estufa numa temperatura de 105° C, por 8 horas. Após este procedimento, os cadinhos foram levados novamente ao dessecador até esfriar e por fim pesados para obter o peso final da amostra.

O cálculo da matéria seca foi realizado de acordo com as equação 6 e 7 :

$$\text{Peso seco} = (\text{peso a } 105^\circ \text{ C} - \text{peso do cadinho}) \quad (\text{Equação 6})$$

$$\text{Matéria seca definitiva (\%)} = \frac{\text{peso seco} \times 100}{\text{peso amostra}} \quad (\text{Equação 7})$$

Para determinação da matéria mineral (cinzas), os cadinhos (250 mL) contendo as amostras provenientes da determinação da matéria seca, foram levados para a mufla a 550° C até queima total da matéria orgânica, por aproximadamente 4 horas.

O cálculo da matéria seca foi realizado de acordo com as equação 8 e 9 :

$$\text{Peso seco} = (\text{peso a } 105^{\circ} \text{ C} - \text{peso do cadinho}) \quad (\text{Equação 8})$$

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{peso seco } 550^{\circ} \text{ C} \times 100}{\text{peso a } 105^{\circ}} \quad (\text{Equação 9})$$

A umidade da biomassa foi calculada de acordo com a equação 10:

$$\text{Umidade (\%)} = (100 - \% \text{ matéria seca definitiva}) \quad (\text{Equação 10})$$

4.7 Determinação das fibras totais

A determinação das fibras totais, proveniente de ambos os cultivos (com e sem nitrogênio) foram realizadas por análises em triplicatas, de acordo com a metodologia proposta pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos – LQA, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo.

Pacotes plásticos (200 mL) foram pesados e em seguida adicionados ao mesmos 1 g de biomassa, que ficaram em repouso por 5 minutos em 200 mL de hexano. Passado este tempo, álcool etílico foi burrificado dentro dos pacotes. Os pacotes foram levados para estufa à 105° C até secagem total das amostras. Na sequência os pacotes foram selados e acondicionados nas bandejas do aparelho determinador de fibras, as quais foram totalmente cobertas com ácido sulfúrico (1,25%). Os pacotes permaneceram no aparelho disseccador por 30 minutos à 90° C. Posteriormente a este procedimento, foram realizadas 2 lavagens sucessivas nos pacotes com água deionizada fervente. Novamente foram adicionados ácido

sulfúrico ao aparelho, seguidas de mais duas lavagens com água deionizada, igualmente o procedimento inicial, permanecendo por mais 30 minutos em reação.

Em seguida, os pacotes foram suspensos dentro de um béquer contendo álcool etílico, retirados e secados com auxílio de papel toalha.

Por fim, os pacotes foram levados para estufa à 105° C por 3 a 4 horas e após retirá-los, deixados esfriar em dessecador e posterior pesagem dos mesmos.

O cálculo da fibra total foi realizado de acordo com a equação 11:

$$\text{Fibra Bruta (\%)} = \frac{A - T \times 100}{P} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde: A = peso do pacotinho + resíduo, em grama

T = peso do pacote

P = peso da amostra (g)

4.8 Determinação dos carboidratos totais

A quantidade de carboidratos totais foi calculada através dos dados obtidos nas análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras presentes na biomassa. Neste trabalho, os dados de percentual lipídico para a determinação dos carboidratos totais foram obtidos pelo método Soxhlet, utilizando-se como solvente éter, conforme metodologia proposta pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985.

O cálculo dos carboidratos totais foi realizado de acordo com a equação 12:

$$\text{Carboidratos} = 100 - (\% \text{ umd} + \% \text{ cinz} + \% \text{ prot} + \% \text{ lip} + \% \text{ fib}) \quad (\text{Equação 12})$$

Onde: % umd = umidade

% cinz = cinzas

% prot = proteínas

% lip = lipídeos

% fib = fibras

4.9 Extração do óleo

A extração dos lipídeos foi realizada pelo método proposto por Blight e Dyer (1959), adaptado por Chen et al. (2012). A extração foi realizada em diferentes temperaturas: 30° C e 45° C. Os ensaios foram conduzidos em triplicata para cada variável. Inicialmente pesaram-se 50mg de biomassa seca, em tubos do tipo Falcon (15 mL). Aos tubos foi misturada 5 mL de solução, contendo clorofórmio/metanol na proporção 1:2 (v/v), homogeneizado por 30 segundos e em seguida levadas a banho-maria por 60 minutos, nas respectivas temperaturas de extração.

Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por 2 vezes. Ao final de cada etapa o sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta de Pasteur e alíquota foi inserida em outro tubo do tipo Falcon (50 mL).

Após a junção das três alíquotas de sobrenadante, clorofórmio e solução de cloreto de sódio a 1% foi adicionado até que o volume final ficasse na proporção de 1:1:0,9 de clorofórmio/metanol/água. A solução foi deixada sedimentar por aproximadamente 20 minutos.

Após esse tempo, observou-se a formação de duas fases, sendo a fase inferior composta por clorofórmio e os lipídeos extraídos. Esta fase foi cuidadosamente transferida com auxílio de uma pipeta de Pasteur para um tubo de ensaio de massa conhecida (P1). As amostras foram levadas para a estufa a 60°C para completa evaporação dos solventes até apresentarem massa constante. O tubo foi, então, novamente pesado (P2) para aferir a quantidade de lipídeos extraídos. O teor de lipídios foi determinado a partir da diferença de massa entre P2 e P1, ou seja, (P2-P1) e relacionado a quantidade de biomassa utilizada para extração (0,05g).

4.10 Determinação da composição dos ácidos graxos do óleo extraído

Visando a conversão do óleo obtido em ésteres metílicos, realizou-se a derivatização destes, utilizando a metodologia de esterificação de lipídios (HARTMANN; LAGO, 1973), descrita na sequência, para ambos os cultivos.

Adicionaram-se 4 mL de solução 0,5 equivalente/L de NaOH em metanol nos tubos contendo o óleo. Fechou-se bem o tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho de água em ebulição, até dissolver os glóbulos de óleo e a solução tornar-se transparente. Esfriou-se o tubo de ensaio em água corrente e adicionaram 5 mL do

reagente esterificante, metanol. O tubo foi novamente levado ao aquecimento em banho maria, e em seguida foram adicionados 4 mL da solução saturada de cloreto de sódio e 2 mL de isooctano, sendo por fim, agitado vigorosamente por mais 30 segundos. Deixou-se o tubo em repouso por aproximadamente 90 minutos, na geladeira. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e armazenado em freezer para posterior análise por cromatografia em fase gasosa.

4.11 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso acoplado ao detector de ionização de chama (GC-FID) Perkin Elmer modelo Clarus - 680, com amostrador automático, contendo uma coluna específica para separação de ácidos graxos – Select Fame CP-7420 - 100 m x 0,25 mm. Como gás de arraste utilizou-se o hélio, numa razão *split* de 1:10. A análise foi realizada com programação de temperatura da coluna, iniciando a 80° C, com aquecimento até 250° C a uma taxa de 5 °C/min. A temperatura do detector foi de 250° C e do injetor de 240° C.

A partir do cromatograma obtido para as amostras analisadas foi possível identificar, por meio da comparação dos tempos de retenção na coluna com uma amostra padrão (FAME-37), os respectivos ésteres etílicos/metílicos presentes na amostra e suas respectivas porcentagens (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo da microalga

O crescimento dos cultivos foi monitorado pela densidade óptica e, também, pela turbidez. Através da construção da curva padrão, previamente construída, foi possível avaliar a dinâmica de crescimento e a produtividade da microalga. A concentração inicial de biomassa também foi determinada por esse procedimento (BAUMGARTNER et al., 2013).

Foram realizados duas condições de cultivo, uma com supressão total de nitrogênio (SN – sem nitrogênio) e outra com meio de cultivo padrão (TAP), contendo quantidade padrão de macronutrientes nitrogenados (CN – com nitrogênio).

A condição de cultivo que apresentou melhor produtividade foi o meio CN em comparação ao meio SN. Embora a taxa de crescimento em ambos os cultivos tenha sido significativamente parecidas nos primeiros dias (1 – 6 dias), o cultivo CN apresentou maior produtividade após sete dias de cultivo, sendo que constatou-se um aumento da produtividade a partir do décimo dia de cultivo, com maior concentração de biomassa no período de 8 – 10 dias (301,9 g.L⁻¹), conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Produtividade (g.L⁻¹.dia⁻¹) da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada no meio TAP - com e sem nitrogênio.

Intervalo (dia)	Com Nitrogênio	Sem Nitrogênio
1 – 2	1,35	2,61
2 – 3	6,30	5,72
3 – 4	14,02	14,58
4 – 5	13,86	21,14
5 – 6	36,56	30,94
6 – 7	58,07	48,53
7 – 8	79,21	47,65
8 – 9	137,2	93,38
9 – 10	164,7	59,01
10 – 11	78,49	65,45
11 – 12	28,87	30,40
12 – 13	13,16	9,22
13 – 14	9,45	8,38

Fonte: Autor, 2016.

O cultivo SN apresentou maior concentração de biomassa em geral, após oito dias de cultivo, sendo que os períodos de maior concentração de biomassa foram do 8 – 9 dia (93,38 g.L⁻¹) e 10 – 11 dia (65,45 g.L⁻¹), conforme pode ser observado na Tabela 7.

Ambos os cultivos (CN e SN), apresentaram maior produtividade na fase exponencial, atendendo a dinâmica de crescimento microalgal, atingindo a fase máxima de multiplicação celular e de crescimento exponencial do número de células (ANDERSEN, 2005). No cultivo CN, a microalga apresentou redução da concentração de biomassa e consequentemente produtividade, após dez dias de cultivo. No cultivo SN, observou-se que a concentração de biomassa decaiu após onze dias de cultivo. A redução do crescimento, conforme citado anteriormente, pode ocorrer em consequência da diminuição da quantidade de luz que chega às células devido a grande concentração da biomassa, a diminuição de nutrientes, a alterações de pH e inclusive dos próprios metabólitos produzidos pelas células (RICHMOND, 2004). A Figura 9 demonstra a comparação do crescimento da microalga em ambos os cultivos (TAP – CN e SN).

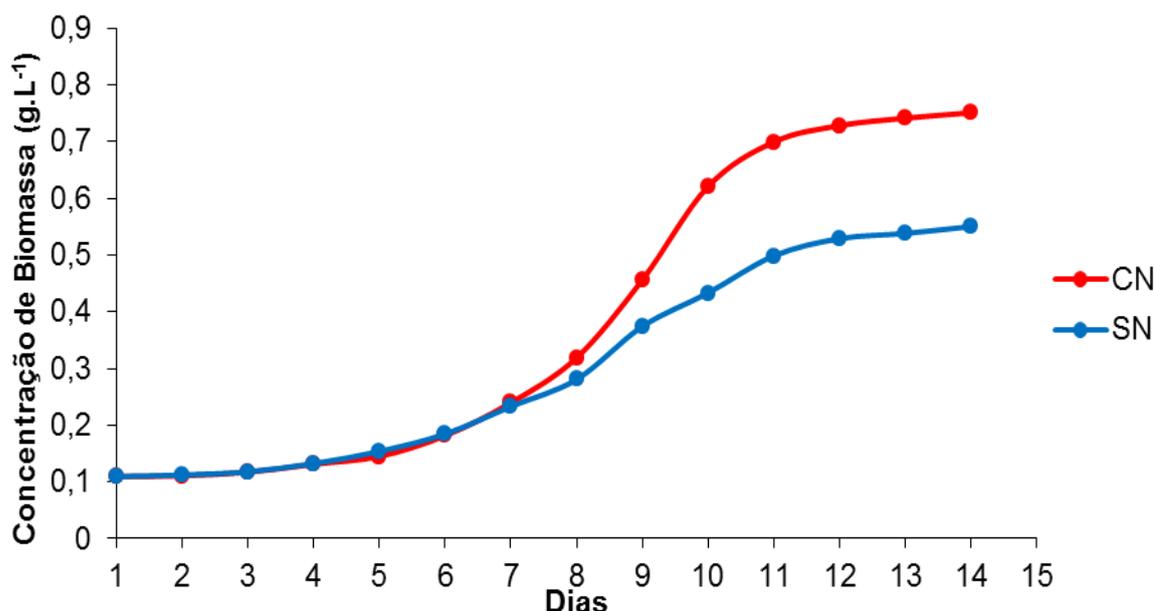


Figura 9. Concentração de *Chlamidomonas reinhardtii*, cultivada no meio TAP - com e sem nitrogênio, em função do período de cultivo

Fonte: Autor, 2016.

A dinâmica de crescimento observada no cultivo CN é similar a encontrada por Villela (2014), utilizando o mesmo meio de cultivo líquido (TAP) para *C.*

reinhardtii transgênica, criada com objetivo de acelerar a dinâmica de crescimento da espécie, visando a produção de biocombustíveis. O crescimento da espécie em questão foi de oito dias, aproximadamente metade do observado neste trabalho, constatando-se que a microalga entrou em fase exponencial e estacionária após três dias de cultivo, reduzindo sua taxa de crescimento após seis dias de cultivo.

Cakmak et al., (2014); Msanne et al., (2012); James et al., (2011); em trabalhos com *C. reinhardtii* (CC-124 e CC-125), cultivada em meio TAP, o mesmo utilizado neste trabalho, observaram que a supressão do crescimento da microalga foi significativo em cultivos com a ausência de nitrogênio (TAP -N), quando comparado as taxas de crescimento em meio com nitrogênio (TAP +N). James (2011) e colaboradores, no cultivo sem nitrogênio, constataram no quarto dia de ensaio 1,4 g.L⁻¹ de biomassa, valor este muito próximo ao encontrado neste trabalho, que no quarto dia apresentou 1,3 g.L⁻¹.

Resultados similares, mostrando melhor crescimento em cultivo com nitrogênio, foram constatados por James (2013) e colaboradores, em novos estudos com objetivo de comparar o perfil de lipídeos de *C. reinhardtii* (CC-125) com outra linhagem da mesma espécie (BAF-J5), cultivadas novamente, com e sem nitrogênio em diferentes temperaturas.

Trabalhos relatando a dinâmica de crescimento de *C. reinhardtii* em cultivo SN são escassos na literatura, entretanto, em estudos com a microalga *Scenedesmus* sp., também em cultivo sem nitrogênio (N0) e com nitrogênio em diferentes doses, Hakalin (2014) e colaboradores, constataram após 10 dias de cultivo que a densidade da espécie em estudo foi de 4,2 g.L⁻¹, valor igual ao presente estudo que, no décimo dia de cultivo apresentou densidade de 4,3 g.L⁻¹ de biomassa. Outros valores de biomassa obtidos no decorrer do cultivo não foram citados pelo autor, porém, os ensaios foram realizados somente até o décimo dia, demonstrando que após esse período *Scenedesmus* sp., entrou em fase estacionária. Os autores observaram melhor dinâmica de crescimento da espécie quando este nutriente estava presente no meio de cultivo, pois, as maiores densidades de algas foram alcançadas com os tratamentos onde o meio de cultivo continha significativas concentrações de nitrogênio.

Martins (2014), ao avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio sobre a biomassa e produção lípidica em microalgas verdes durante 15 dias de cultivo, constatou que, em concentrações normais de nitrogênio no meio de cultivo,

as espécies apresentaram melhor dinâmica de crescimento quando comparada aos cultivos com quantidades extramamente baixas do nutriente. Para a microalga *Desmodesmus spinosus*, espécie com características morfológicas (9,7µm, cloroplasto único e grande) e fisiológicas às de *C. reinhardtii*, os resultados após 10 e 14 dias de cultivo, foram de respectivamente 4,7 g.L⁻¹ e 5,2 g.L⁻¹ de biomassa, dados similares aos encontrados neste trabalho para os mesmo dias de cultivo (4,3 g.L⁻¹ e 5,5 g.L⁻¹).

A menor taxa de crescimento obtida em cultivo SN, também justifica-se no fato que a ausência deste nutriente no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam produzidos em maior escala, resultando em menor síntese de aminoácidos que contribuem para a composição estrutural das microalgas (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

O meio de cultivo CN mostrou no geral produtividades maiores, quando comparado ao meio SN, sendo que a produtividade máxima (93,38 g.L⁻¹.dia⁻¹) obtida entre o oitavo e nono dia nesta condição de cultivo, é significativamente menor que a produtividade máxima obtida no decorrer de diversos períodos no CN.

Esses resultados demonstram que a viabilidade na obtenção de biomassa da microalga *C. reinhardtii* para fins energéticos, apresenta melhores resultados nas condições de cultivo CN. Porém, estes resultados não excluem a possibilidade do cultivo desta espécie, sem ou com a supressão de doses de nitrogênio, pois, diversos estudos (MANDAL; MALLICK, 2009; MATA et al., 2010; JAMES et al., 2011; CAKMAK et al., 2014; MSANNE et al., 2012), demonstram um aumento significativo no teor lipídico na biomassa das microalgas, nestas condições de cultivo, sendo, portanto, eficaz para produção de biocombustíveis.

5.2 Recuperação da biomassa

A recuperação da biomassa foi realizada pela adição de flocculante, decantação e filtração em telas 20 mesh, obtendo-se a biomassa. A figura 10 demonstra os processo de obtenção da biomassa.

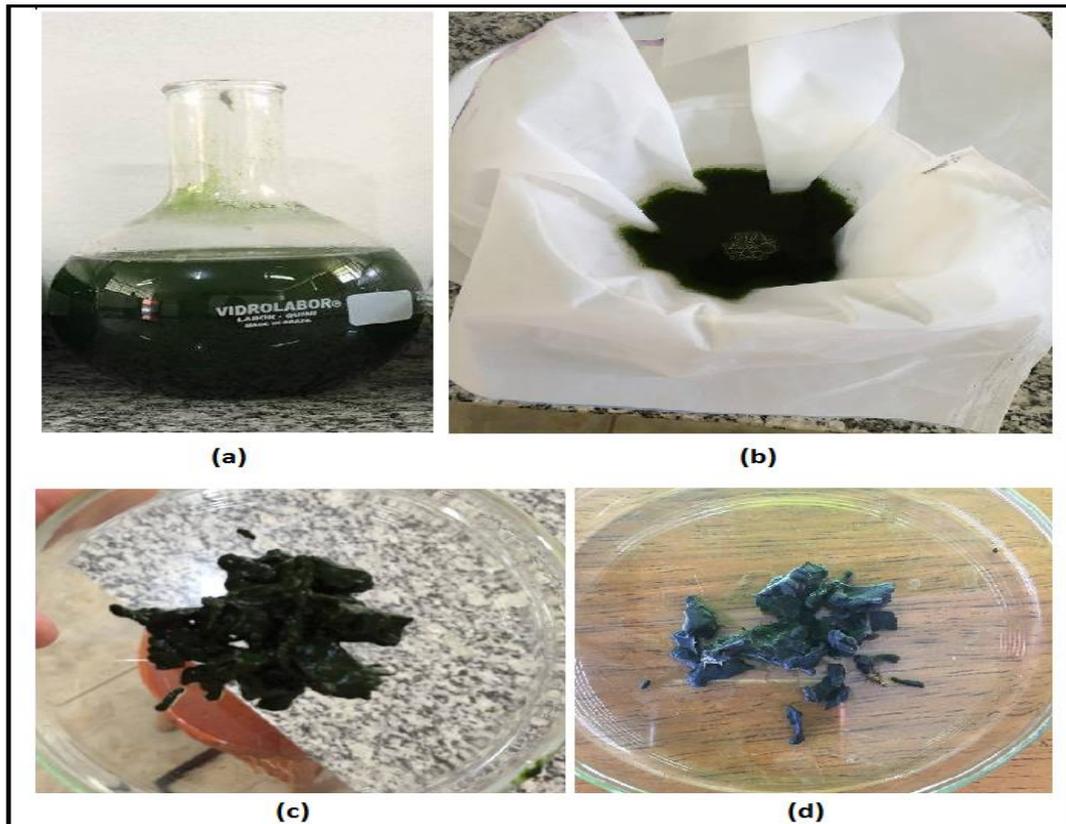


Figura 10. Recuperação da biomassa: a) Decantação após adição do floculante; b) filtração; c) recuperação da biomassa e d) biomassa algácea seca

Fonte: Autor, 2016.

Após secagem, a biomassa foi triturada obtendo-se uma massa homogênea (Figura 11), para utilização nos processos de caracterização e extração do óleo.

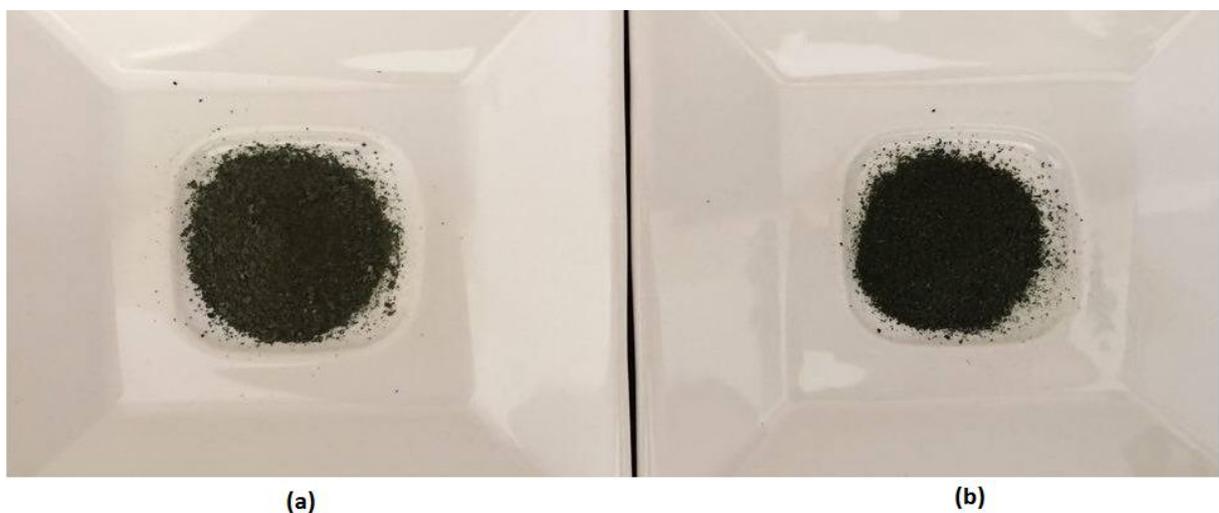


Figura 11. Biomassa seca e triturada: a) Biomassa proveniente do cultivo com nitrogênio; b) biomassa proveniente do cultivo sem nitrogênio

Fonte: Autor, 2016.

5.3 Teor de clorofila *a* e *b*

Dentre as duas condições de cultivo, o cultivo CN apresentou maior teor de clorofila *a* e *b* em comparação com o cultivo SN (Tabela 8). A redução na quantidade de nitrogênio no meio de cultura possibilita a síntese de carboidratos e lipídeos em maior quantidades, por outro lado, elevadas concentrações de nitrogênio no meio de cultivo pode elevar o teor de clorofila na biomassa microalgal (BERTOLDI, 2008). Segundo Lourenço (2006) a clorofila *a* é o principal pigmento de fotossíntese, enquanto que outras clorofilas são consideradas pigmentos acessórios, de modo que podem ou não estar em conjunto a clorofila *a*.

Tabela 8. Teor de Clorofila *a* e *b* (mg.L⁻¹) de *Chlamydomonas reinhardtii* em cultivo com e sem nitrogênio.

	Cultivo CN	Cultivo SN
Clorofila <i>a</i>	30,16	24,94
Clorofila <i>b</i>	6,81	3,55

Fonte: Autor, 2016.

Msanne et al., (2012), em seus trabalhos com *C. reinhardtii*, também cultivada com e sem nitrogênio à 25^o C, constataram maior teor de clorofila (*a* e *b*) no meio de cultivo com presença deste nutriente, comparando ao meio sem nitrogênio.

De modo geral, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o baixo teor de clorofila presente no meio de cultivo SN, influencia diretamente no crescimento e produtividade da microalga em estudo. A deficiência do nitrogênio no meio de cultivo de microalgas pode limitar o crescimento e alterar a concentração de clorofila. Demais trabalhos (SANTOS, 2003; MSANNE et al., 2012; JAMES et al.; 2012) realizados com microalgas em cultivo com e sem nitrogênio, relatam a relação entre a dinâmica de crescimento microalgal e o teor de clorofila presente na biomassa, demonstrando que a deficiência energética em virtude dos baixos teores de clorofilas na ausência deste nutriente no cultivo, prejudica o crescimento destes microrganismos. Tamburic et al. (2011), afirmam que, no caso das algas verdes a viabilidade celular pode ser diretamente relacionada com a síntese de pigmentos, tais como a clorofila.

Mesmo que outros fatores, como a intensidade luminosa, temperatura, agitação, estejam diretamente relacionados com a síntese de pigmentos, durante o processo fotossintético, estes foram padronizados e controlados nas condições de cultivo, sendo, portanto, a provável justificativa para os resultados obtidos, a deficiência de nutriente no meio de cultivo, no caso, o nitrogênio.

5.4 Determinação de proteínas e carboidratos totais

A redução na quantidade de nitrogênio no meio de cultivo possibilita que lipídeos e carboidratos sejam sintetizados, reduzindo o teor de proteínas constituintes da biomassa (BERTOLDI, 2008).

As análises realizadas com a biomassa de *C. reinhardtii* para ambas as condições de cultivo, demonstram, mesmo que minimamente, a redução do teor de proteínas quando esta é cultivada com a privação de nitrogênio e aumento do teor de carboidrato sob esta mesma condição de cultivo, conforme demonstra a Tabela 9.

Tabela 9. Teor de Proteínas totais e Carboidratos totais na biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada com e sem nitrogênio (%).

	Cultivo CN	Cultivo SN
Proteína	40,48	36,13
Carboidrato	8,85	12,16

Fonte: Autor, 2016.

Cakmak et al., (2012) em trabalhos com *C. reinhardtii* (CC-124 e CC-125) sob privação de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, observaram redução do teor de proteínas totais em ambas as cepas cultivadas em meio TAP sem nitrogênio, comparado ao cultivo realizado com presença deste nutriente. Posteriormente, estes mesmos autores em estudos com a cepa CC-124, cultivada com privação de diferentes nutrientes, observaram o mesmo para o teor de proteínas totais, constatando-se um decréscimo desta macromolécula na biomassa cultivada sem nitrogênio no meio de cultivo.

Msanne e colaboradores (2012) e Cakmack e colaboradores (2012), em trabalhos realizados com *C. reinhardtii* (CC-125), observaram aumento significativo no teor de carboidratos totais na biomassa cultivada com supressão total de nitrogênio.

Estudos realizados com outras espécies de Clorofíceas, demonstram aumento na quantidade de lipídeos e de carboidratos na biomassa em condições de privação de nitrogênio no cultivo. Santos et al., (2012) observou uma diminuição de 39,02% do teor proteico e um aumento de 91,15% do teor de carboidratos em *Spirulina máxima* cultivada sob privação de nitrogênio.

Estes resultados corroboram com resultados obtidos neste trabalho, demonstrando assim, que a ausência de nutrientes no meio de cultivo, culmina em condições de estresse metabólicos, transformando os nutrientes disponíveis em substância de reserva energética, como carboidratos e lipídeos.

A redução dos teores de proteínas, ocorrido pela depleção de nitrogênio direciona o metabolismo das microalgas antes voltado à multiplicação celular e, portanto, sendo fundamental a síntese de moléculas estruturais, para a produção de componentes de reserva, preparando a célula para um período de privação nutricional (ALONSO et al., 2000; XU et al., 2012).

Deduz-se, portanto, que estas alterações nas condições de cultivo, são oportunas para aplicação em um sistema de produção de algumas substâncias de interesse produzidas por esta microalga em maior escala e economicamente viável, tais como, substâncias energéticas destinadas a produção de biocombustíveis.

5.5 Extração dos lipídeos

A Figura 12 e Tabela 10, representam os resultados obtidos para lipídeos totais extraídos da biomassa seca em diferentes temperaturas (30 e 45°C), pelo método proposto por Bligh e Dyer (1959), modificados por Chen et al. (2012).

Tabela 10. Massa de lipídeos totais da extração do óleo da microalga *C. reinhardtii* pelo método Bligh e Dyer (1959), adptado por Chen et al. (2012).

g lipídeos totais/g biomassa seca (%)			
Cultivo com nitrogênio		Cultivo sem nitrogênio	
30° C	45° C	30° C	45° C
3,6 ± 0,94	5 ± 0,52	6,86 ± 0,94	8,2 ± 1,73

Fonte: Autor, 2016

A análise estatística da extração pelo Teste de Tukey mostrou que houve diferença significativa entre as extrações ($p < 0,05$), sendo que a extração a 45 °C SN não foi diferente da extração a 30 °C SN, mas diferiu das outras duas temperaturas. Já, a extração a 30 °C S/N não foi diferente estatisticamente da extração a 45 °C C/N. E para a extração a 30 °C CN o teste mostrou que diferiu estatisticamente das extrações a 30° C e 45 °C SN. A figura 12 mostra o valor médio do teor lipídico extraído em diferentes temperaturas da microalga *C. reinhardtii*.

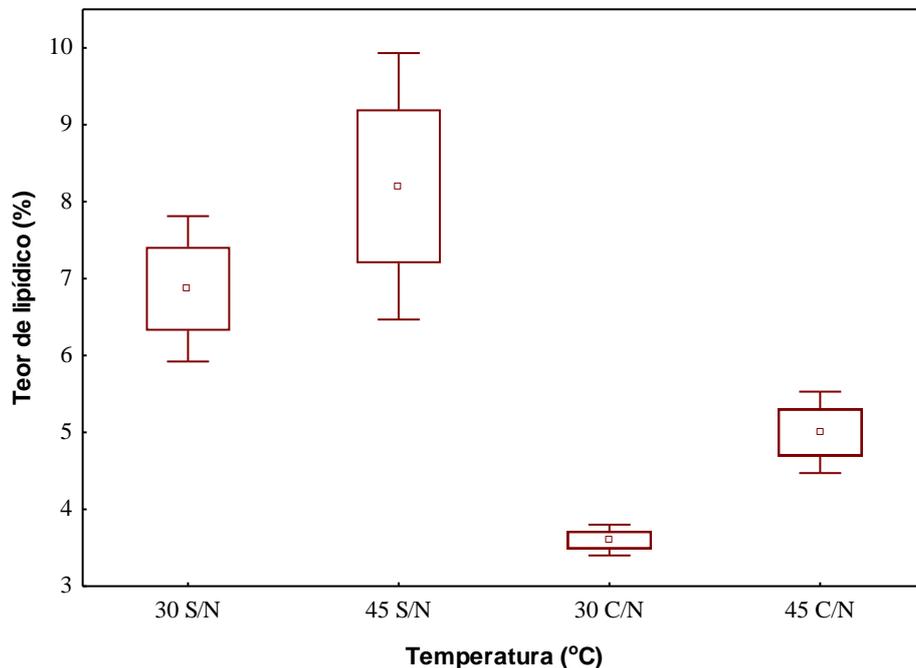


Figura 12. Valores médios do teor lipídico extraído em diferentes temperaturas da microalga *C. reinhardtii* cultivada em meio com e sem nitrogênio

Fonte: Autor, 2016.

De acordo com a literatura, observa-se o aumento no teor lipídico por grama de biomassa, quando *C. reinhardtii* foi cultivada na ausência de nitrogênio.

Para ambas as temperaturas (30° C e 45° C) de extração testadas neste trabalho, o teor lipídico (0,07g e 0,08g) da biomassa seca foi maior quando a microalga foi privada de nitrogênio no meio de cultivo. Em comparação com o teor lipídico (0,04g e 0,05g) obtido nos processos de extração da biomassa cultivada em meio TAP com nitrogênio em ambas as temperaturas, houve um aumento de 3% no rendimento de lipídeos totais da biomassa, quando estas foram privadas deste nutriente. A Figura 13 demonstra o teor lipídico presente em uma grama da biomassa seca de *C. reinhardtii*

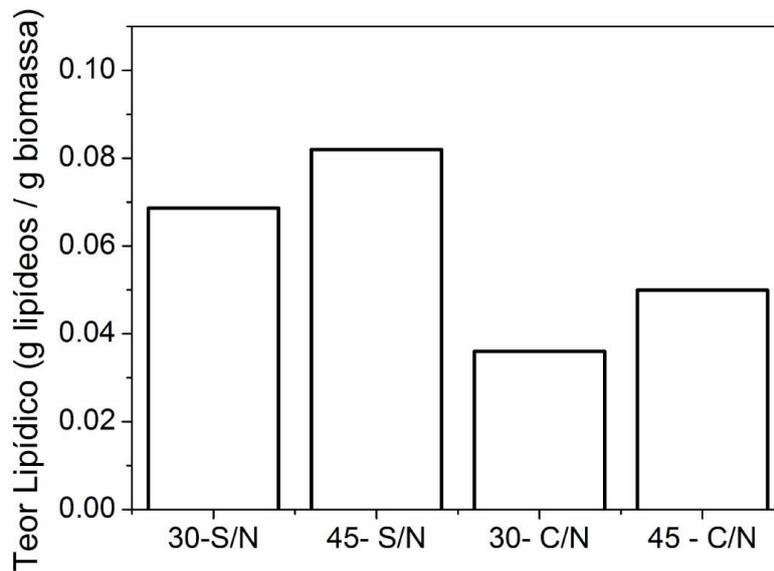


Figura 13. Conteúdo lipídico extraído em diferentes temperaturas da microalga *C. reinhardtii* cultivada em meio com e sem nitrogênio

Fonte: Autor, 2016.

A extração pela metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), modificado por Chen et al. (2012), apresentou um bom resultado de rendimento em lipídeos totais. Uma das vantagens deste método é a formação de um sistema bifásico a partir das proporções de líquidos (clorofórmio/metanol/água) adicionados durante o processo de extração. O clorofórmio, solvente apolar utilizado por este método, extrai eficientemente das células algácea lipídios neutros, classe de lipídeo mais desejado para a produção de biodiesel (WAHLEN et al., 2011). O metanol, solvente polar, contribui para um maior rendimento em lipídeos na extração da biomassa algácea (BAUMGÄRTNER et al., 2013). Esse sistema possui as propriedades ideais para uma extração eficiente, superando as interações entre os lipídios e a célula das microalgas, dissolvendo-os prontamente.

A Figura 14 mostra o sistema bifásico formado durante o processo de extração do óleo, utilizando os solventes acima citados.

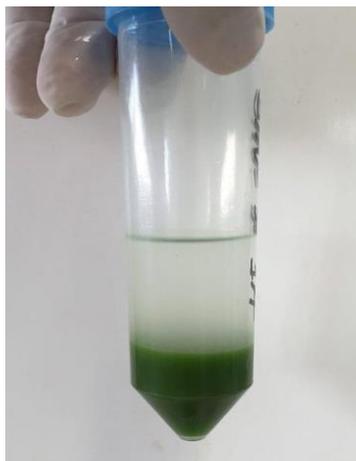


Figura 14. Extração do óleo da microalga *C. reinhardtii* pelo método Bligh e Dyer (1959), adaptado por Chen et al. (2012) - Sistema bifásico com solventes (clorofórmio/metanol/água)

Fonte: Autor, 2016.

A extração realizada aos 45° C para ambas as condições de cultivo (CN e SN), foi efetivamente melhor, resultando, embora que minimamente, em um maior rendimento de óleo obtido quando comparado à extração realizada a 35° C. Estes resultados demonstram que a temperatura influencia nos processos de extração e que temperaturas altas, são mais viáveis para obtenção de lipídeo a partir da biomassa de *C. reinhardtii*. Chen et al. (2012), ao adaptar o método Bligh e Dyer (1959), utilizou a temperatura de 60° C para os processos de extração. Neste trabalho as temperaturas testadas foram outras, menores que a sugerida pelo autor, pois, um dos objetivos foi analisar a qualidade do óleo obtido. Sendo assim, altas temperaturas podem oxidar o conteúdo lipídico, influenciando nas propriedades do mesmo.

Informações sobre diferentes temperaturas utilizadas em processo de extração de lipídeos em microalgas são escassas. O processo de extração lipídica a partir de biomassa algácea apresenta diversos desafios, exigindo na maioria das vezes, abordagens novas ou modificadas, gerando resultados não encontrados anteriormente com sementes de outras oleaginosas (HU et al., 2008). Geralmente, a metodologia utilizada na análise dos lipídeos de algas é baseada na extração com solventes e análise gravimétrica do óleo extraído, no entanto, esta técnica não foi ainda padronizada para obtenção de óleo de biomassa algácea (BAUMGÄRTNER et al., 2013).

Embora não sejam os valores encontrados na literatura para essa espécie de microalga, os teores lipídicos podem variar significativamente para uma mesma

espécie, de acordo com diversos fatores que influenciam na síntese e armazenamento destas substâncias na biomassa, bem como, nos diferentes processos de extração descritos para obtenção de óleo de microalgas (RICHMOND, 2004).

Diversos autores tem observados em seus estudos, melhor rendimento no teor lipídico na biomassa de microalgas, quando estas são privadas total ou parcialmente de nitrogênio no meio de cultivo. James e colaboradores (2011), ao extrair óleo da biomassa de *C. reinhardtii* (CC-124 e CC-125), cultivada em meio TAP padrão ou com supressão total de nitrogênio, constataram maior teor lipídico na biomassa para ambas as cepas testadas em cultivo sem nitrogênio (12% CC-124 e 13% CC-125), quando comparado com o teor lipídico na biomassa cultivada em meio TAP padrão, com nitrogênio (9% - CC-124 e CC-125). Estes valores são similares ao rendimento lipídicos constatados neste trabalho.

Msanne e colaboradores (2012), ao extrair óleo da biomassa de *C. reinhardtii* (CC-125) pelo método proposto por Bligh e Dier (1959), observou maior teor lipídico quando a microalgas foi cultivada em meio isento de nitrogênio (14%), valor este, que comparado ao teor lipídico presente na biomassa cultivada com nitrogênio (10%), é significativamente mais rentável.

James e colaboradores (2012), ao cultivar a microalga *C. reinhardtii* em meio TAP sem nitrogênio (TAP -N), em diferentes temperaturas, constatou igualmente, maior teor lipídico (12,5%), quando o nutriente estava ausente do meio de cultivo a 25° C, mesma temperatura na qual o cultivo da biomassa foi realizada neste trabalho. O teor lipídico (10,5%) da biomassa algácea cultivado em meio TAP padrão (TAP medium) já era conhecido pelos autores em trabalhos realizados anteriormente a este, podendo-se desta forma comparar e comprovar o maior rendimento lipídico obtido.

Cakmak e colaboradores (2012), constataram um aumento significativo no teor de lipídeos em *C. reinhardtii* (39,8% CC-124 e 41,2% CC-125) cultivadas em meio TAP sem nitrogênio por um período de sete dias.

Constata-se assim, que para obter-se um maior rendimento do conteúdo lipídico a partir da biomassa de microalgas de modo geral e em específico de *C. reinhardtii*, a privação de nitrogênio no meio de cultivo é uma alternativa promissora com altas possibilidades de sucesso.

Esses resultados podem ser explicados bioquimicamente, pois quando a microalga é submetida a uma condição de stress (que neste trabalho foi a privação de nitrogênio) altera a via biossintética lipídica podendo levar ao aumento de lipídeos totais, essencialmente à produção e acumulação de triglicéridos.

Embora os resultados obtidos neste trabalho sejam para lipídeos totais, sendo que, para a produção de biodiesel, o interesse maior está na extração dos lipídios neutros (WAHLEN et al., 2011), grande parte dos trabalhos encontrados na literatura, que trazem o rendimento na extração de óleo da biomassa algácea, também não fazem nenhuma distinção entre lipídios totais e/ou neutros ((BAUMGÄRTNER et al., 2013; MANDAL, MALLICK, 2009).

5.6 Determinação da composição dos ácidos graxos do óleo extraído

Os ácidos graxos que podem estar presentes em um triacilglicerídeo são denominados de saturados (Cn: 0), monoinsaturados (Cn: 1) e poli-insaturados com duas ou três ligações duplas (Cn: 2,3). A porcentagem mássica destes compostos foi determinada utilizando-se a metodologia de derivatização do óleo, seguida de cromatografia em fase gasosa (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

A avaliação dos triagliceróis quanto à sua composição em ácidos graxos é de fundamental importância, dada a influência destes sobre propriedades do biodiesel como; a viscosidade, a massa específica, o ponto de entupimento de filtro a frio e a estabilidade oxidativa (FRANCO et al., 2013).

Os resultados obtidos da composição de ácidos graxos do óleo para microalga *C. reinhardtii* para as duas condições de cultivo e diferentes temperaturas de extração do óleo, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Composição em ácidos graxos (%) do óleo de *C. reinhardtii*, cultivada com e sem nitrogênio obtida por cromatografia gasosa.

Ácidos Graxos	Condição de Cultivo / Temperatura de Extração			
	CN/30° C	CN/45° C	SN/30° C	SN/45° C
C 8:0	0,56	0,56	0,39	0,40
C 10:0	0,12	0,22	0,24	0,17
C 11:0	0,20	0,16	0,22	0,22
C 12:0	0,90	0,66	0,57	0,43
C 14:0	0,23	0,47	0,16	0,40
C 14:1	13,72	10,88	10,27	7,24
C 15:1	0,31	0	0,41	0,26
C 16:0	14,52	19,90	13,11	18,85
C 16:1	12,50	10,05	9,78	6,25
C 17:0	0	0	1,83	0,42
C 17:1	0,28	0,43	0,86	0,73
C 18:0	2,21	6,97	3,81	4,94
C 18:1n9t	0	0,22	1,38	1,85
C 18:1n9c	2,04	2,74	4,59	6,47
C 18:2n6t	0	0,37	0,04	0,61
C 18:2n6c	4,05	7,08	5,67	8,30
C 18:3n6	0	0	0	0,44
C 18:3n3	1,84	4,07	6,12	6,11
C 20:1	12,59	10,29	9,89	7,66
C 20:5	0	1,82	0,73	0,26
C 21:0	0,52	0	0,24	0
C 22:1	14,04	12,05	10,51	7,22
C 22:2	0	0,72	0	0
C 24:0	0,25	0	0,71	0
C 24:1n9	13,98	8,14	5,52	4,36
C 22:6n3	5,14	2,20	12,74	16,40
AGS	19,51	28,94	21,27	25,83
AGMI	69,46	54,80	53,21	42,04
AGPI	11,03	16,26	25,52	32,12

Fonte: Autor, 2016 (AGS – Ácidos graxos saturados, AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados, AGPI – Ácidos graxos poli-insaturado)

Observa-se que a composição dos ácidos graxos presente no óleo extraído da biomassa de *C. reinhardtii*, não apresentou significativa distinção entre os parâmetros estudados.

A partir das composições apresentadas na tabela 14, pode-se verificar que houve predominância de ácidos graxos saturados e monoinsaturados para todos os parâmetros estudados, entre os quais o C 16:0 (ácido palmítico) e C 22:1 (ácido erúxico) se destacaram.

Para o cultivo CN nas duas temperaturas de extração, constatou-se a presença em maiores quantidades dos seguintes ácidos graxos em ordem decrescente: C 16:0, C 22:1, C 14:1, C 24:1n9, C 20:1 e C 16:1. Os demais ácidos graxos presentes, estão abaixo de 10%, no entanto, suas totalidades demonstram quantidades significativas de ácidos graxos monoinsaturados (C 14:1, C 16:1, C 20:1, C 22:1 e C 24:1n9) nas duas temperaturas de extração, sendo um total de 69,46% em 30° C e 54,80% em 45° C.

A composição de ácidos graxos presentes no óleo da biomassa cultivada SN, também apresentou maiores quantidades de monoinsaturados (C 14:1, C 16:1, C 20:1, C 22:1) em maiores quantidades para as duas temperaturas de extração, constatando-se um total de 53,21% em 30° C e 42,04% em 45° C. No entanto, para esta condição de cultivo, houve um aumento de ácidos graxos poli-insaturados (25,52% e 32,12% em 30° C e 45° C, respectivamente) em relação ao cultivo CN (11,03% e 16,26% em 30° C e 45° C, respectivamente). Dentre os ácidos graxos poli-insaturados em maior composição nas duas temperaturas de extração no cultivo CN, observa-se o C 22:6n3 (DHA).

O ácido palmítico (C 16:0) é o ácido graxo presente em maior quantidade tanto no cultivo CN, quanto no cultivo SN, nas duas temperaturas de extração. Este ácido graxo apresenta predominância na constituição do óleo da maioria da microalgas (D'OCA et al., 2011). A insaturação dos ácidos graxos influencia as características e qualidade do biodiesel. Para que se tenha um biodiesel de alta qualidade são necessários altos teores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (GARCIA et al., 2015, BAUMGÄRTNER et al., 2013; CHISTI, 2007), visto que essa composição, melhora a estabilidade do biodiesel frente à oxidação, o que resulta em aumento da vida útil do biocombustível. Ácidos graxos com menor número de insaturações (C:n0 e C:n1), apresentam também, maior número de cetano, proporcionando uma melhor qualidade à combustão.

Apesar de constatar-se um aumento no teor de ácidos graxos poli-insaturados no óleo extraído da biomassa cultivada SN, o que influencia diretamente no biodiesel produzido a partir deste, ocasionando aumento da viscosidade e reatividade com oxigênio, diminuindo assim a estabilidade oxidativa, por outro lado, traz grandes vantagens para a propriedade ponto de entupimento do filtro a frio, devido ao ponto de fusão dos ácidos graxos poli-insaturados serem menor que dos ácidos graxos saturados, não precipitando com facilidade em regiões de clima frio (GARCIA et al., 2015, BAUMGÄRTNER et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; BOAMAR, 2010) Além disso Apesar de afetar a qualidade do biodiesel, os ácidos graxos poli-insaturado tem grande importância biotecnológica e alto valor comercial (CHISTI, 2007; MOLINA GRIMA et al., 2003).

Por fim, cabe destacar que a composição de ácidos graxos obtidos no óleo da Microalga *C. reinhardtii*, cultivada CN e SN, estão de acordo com os resultados encontrados na literatura, em diversos trabalhos realizados por Cakmak et al., (2014); Msanne et al., (2012); James et al., (2012); James et al., (2011), os quais trabalharam com esta microalga em cultivo com supressões de nitrogênio, indicando a compatibilidade de resultados obtida no presente trabalho, independente da metodologia utilizada na extração dos lipídeos totais.

6 CONCLUSÕES

A biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada em meio com nitrogênio apresentou maior produtividade e crescimento geral em comparação com a biomassa cultivada em meio sem nitrogênio, evidenciando que este elemento é essencial para maiores produtividades de biomassa para espécie em estudo.

O teor de clorofila *a* e *b*, bem como o teor de proteínas totais são menores na biomassa cultivada com supressão de nitrogênio, sendo o teor de carboidratos totais, maior na biomassa cultivada nestas condições, o que indica que a ausência de nitrogênio no meio de cultivo possibilita que substâncias energéticas, tais como lipídeos e carboidratos sejam sintetizados, reduzindo o teor destas substâncias.

Na extração do óleo, foi observado que, a supressão de nitrogênio influencia na produtividade de lipídeos, aumentando os teores destes na biomassa da microalga, apresentando maiores rendimentos quando extraído na temperatura de 45° C, independente da condição de cultivo.

A supressão de nitrogênio no meio de cultivo não interfere significativamente na composição dos ácidos graxos no óleo da biomassa algácea, predominando em sua composição ácidos graxos saturados e mono-insaturados, propícios para a produção de biodiesel.

Desta forma, o presente estudo mostra que, mesmo apresentando menores produtividades de biomassa, o rendimento lipídico da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada em supressão de nitrogênio, apresenta potencial para ser aplicada à produção de biodiesel, evidenciando a importância do desenvolvimento de novos trabalhos, na linha de pesquisa do respectivo trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, J.P.; TORRES, E.; HERRERO, C. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. Monografias, n. 26, Universidade da Coruña: España, 1995. 210 p.

AHMAD, A. L. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p. 584-593, 2011.

ALMEIDA, C. C., et al. **Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Óleo/Biodiesel da Microalga *Chlamydomonas***. In: Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPETRO, 2011, Florianópolis. Anais. Florianópolis. 2011,

ALONSO, D. L. et al., Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytochemistry**, v.54, p. 461-471, 2000.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Appl Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press. 2005. 578 p.

ANDRADE, D. S., et al., Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Eds.). **Microalgas de águas continentais. Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, 2014b. v. 1. p. 266–343.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em: 05 mai. 2016.

ANP (2008). Resolução 07/2008. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em 07 abr. 2016.

ARANDA, D. A. G. The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. **Journal Physical Organic Chemistry**, London, v. 22, n. 7, p. 709 -716, 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2.ed., Viçosa, ed. UFV cap.17, p.374-375, 1999.

ARAUJO, F. P. DE; PAZ, G. M.; OLIVEIRA, Y. L.; LEITE, C. H. P. **Estudo da Viabilidade de Microalgas para Produção de Biodiesel**. In: CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7, 2012, Palmas. Anais. Palmas. 2012.

ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A.; BARBERIO, G. **Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study.** Fuel Processing. vol.86, pág.1679-1693, 2005.

ARREDONDO-VEGA, B. O.; VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.** Centro de Investigaciones del Noroeste –CIBNOR(México). La Paz. 2007. 97 p.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: Estimativa de custos e perspectivas para o Brasil.** Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BAKER, R.; GUNTER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, n.15, p.484-488, 2004.

BARBOSA, M. J. G. V. **Microalgal photobioreactors: scaleup and optimisation.** 2003, 166f. Tese (Doutorado em Ciências) - Wageningen University, 2003.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology.** Boca Ration: Taylor & Francis, 2006.

BAUMGARTNER, Tatiana Rodrigues da Silva. **Cultivo e extração de óleo das microalgas *Chlorella sp* e *Spirulina sp.* para a síntese de Ésteres visando a produção de biodiesel.** Maringá: Departamento de Engenharia Química/Universidade Estadual de Maringá, 2011.

BAUMGARTNER, T. R. S., et al. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 11, n. 2, p. 250–255, 2013.

BAUMGARTNER, Tatiana Rodrigues da Silva. **Biomass Production and Ester Synthesis by *In Situ* Transesterification/Esterificacion Using the Microalga *Spirulina platensis*.** Maringá: Departamento de Engenharia Química/Universidade Estadual de Maringá, 2013. International Journal of Chemical Engineering, v. 2013, p. 1-7, 2013. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijce/2013/425604/> Acesso em: 08 mai. 2015.

BAUMGÄRTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; ZANIN, G. M.; BAUMGÄRTNER, D.; SÉBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Different methods for extracting oil from the microalga *Scenedesmus accuminatus* for biodiesel production. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 10, p. 441 – 445, 2013.

BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology.** Cambridge University Press, 1994, 293p.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology.** Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p. 312–351, 2004.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 54–58, 2008.

BIODIESEL STANDARD; Resolução ANP nº 14, **Diário Oficial da União**, Brasil, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. (Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer). **Can. J. Biochem. Physiol.**, n. 37, p. 911–917, 1959.

BOAMAR, P.F.A. **Combustíveis Automotivos – Especificações Técnicas, Tributos e Legislação**. 1.ed. Florianópolis: ed. Insular, 832 p., 2010.

BOROWITZKA, M. Fats, oils and hydrocarbons. In **Microalgal Biotechnology**. M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka. Cambridge, UK, Cambridge University Press: pp. 257–287. 1998.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRIAN, J. G. The economics of producing biodiesel from algae. **Renewable Energy**, v. 36, 158-162, 2011.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, p. 315-331, 1997.

BRUM, A. A. S., ARRUDA, L. F., REGITANO-D'ARCE, M A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 849-854, 2009.

CAKMAK, Z. E., et al. Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes. **Bioresource Technology**. v. 155, p. 379–387, 2014.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.

CARDOSO, A. S. **Avaliação do potencial das microalgas residuais como uma alternativa à cadeia produtiva do biodiesel**. Tocantins, 2012. Disponível em: http://www.cnpq.br/premios/2010/pjc/docs/3lugar_superior.pdf. Acesso em: 22 nov. 2014.

CARVALHO, A. P.; MALCATA, F. X. Optimization of w-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. **Marine Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 381-388, 2005.

CHEN, L. et al. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource technology**, v. 111, n. 0, p. 208-214, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 3, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y.; Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, p.126-131, 2008.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**. 2013. Disponível em: [http://dx.doi.org/10,1016/j.jbiotec.2013.07.020](http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.020). Acesso em: 28 nov. 2014

COBELAS, M. A.; LECHADO, J. Z.; Lipids in microalgae. **Grasas y aceites**, p.40, 118, 1989.

COLLA, L. M. et al. Fatty acids of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p.55-59, 2004.

COONEY, M.; YOUNG, G.; NAGLE, N.; Extraction of bio-oils from microalgae. **Reviews Separation and Purification**, p.38, 291–325, 2009.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Z. Naturforsch**, v. 61, p. 105-110, 2006.

COUTO, R. M. et al. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. **Engineer Life Science**, p.10, 2010.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (Eds.). **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1996. v. 361. p. 7–48.

CRAVOTTO, G.; L. BOFFA. Improved extraction of vegetable oils under high intensity ultrasound and/or microwaves." **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p.898-902, 2008.

CUNHA, D. C.; CREXI, V. T.; PINTO, L. A. A. Winterização de óleo de pescado via solvente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 207-213, 2009.

DELALIBERA, H.C. **Utilização de óleo de girassol como biocombustível em unidade de potência monocilindro ciclo diesel**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade de Ponta Grossa, 2009.

DEMIRBAS, A. Biodiesel Production from Vegetable Oils Via Catalytic and Non-Catalytic Supercritical Methanol Transesterification Methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, p. 466–487, 2005.

DEMIRBAS, A.; Importance of biomass energy sources for Turkey. **Journal Energy Policy**, p.834-842, 2009.

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

D' OCA, M. G. M, VIÊGAS, C. V., E MACHADO, D. O. **Extração do óleo da microalga *Chlorella pirenoidosa* visando à produção de biodiesel**. In. XVI Encontro de Química da região sul, 2008. FURB 13 a 15 de novembro.

D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p. 1533-1538, 2011.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 1º Ed. Academic Press Limited, London, Reino Unido. p. 333-340, 2005.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic Photosynthesis**. Oxford. Blackwell Scientific Publishers. 1997. 374p.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of lipid research**, v. 46, p. 839–861, 2005.

FABREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMINGUEZ, A.; PATINO, M. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of Artemia species. **Marine Biotechnology**, v. 3, p. 256-263, 2001.

FAO. **Algae-Based Biofuels - A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries**. Roma, Italy. 2009.

FAO. **Algae-Bases Biofuels - Applications and Co-products**. Roma, Italy. 2010.

FIORENTINI, R. et al. Supercritical Fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (arthrospira) platensis*. **Acta Alimentaria**, v.35, n.2, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. **Journal of Biological Chemistry**, 497-509, 1956.

FRANCO, C. L. A. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

GARCÍA, M. C.; SEVILLA, J. M. F.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G.; **J. Appl. Phycol**, v. 12, n. 239, 2000.

GARCIA C. C. et al. Estudo de dois diferentes métodos de extração do óleo da microalga *Scenedesmus acuminatus* para produção de biodiesel. 2015. In. Anais do I Congresso de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Campina Grande – PB.

GOMES, C.; Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Embrapa**. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br/imprcon.htm> Acesso em: 03/06/2016.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel Production with Microalgae as Feedstock: from Strains to Biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1269-1284, 2011.

GREENWELL, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, p.703–726, 2010.

GRIMA, E. M. E. A. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

GROBBELAAR, J. U. ALGAL NUTRITION – MINERAL NUTRITION. RICHMOND, A., (Eds). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science Ltd**. Oxford, London, p. 97-115, 2004.

GUDIN, C.; C. THERPENIER. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. **Advances in biotechnological processes**. v.6, p. 73- 110, 1986.

HAAS, M. J., WAGNER, K. M. Substrate Pretreatment can Reduce the Alcohol Requirement During Biodiesel Production Via in Situ Transesterification. **J Am Oil Chem Soc**, 2011, v. 88, p. 1203–1209, 2011.

HAKALIN, N. L. S. et al. Enhancement of Cell Growth and Lipid Content of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* sp. by Optimizing Nitrogen, Phosphorus and Vitamin Concentrations for Biodiesel Production. **Natural Science**, v. 6, p. 1044-1054, 2014.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renew Sustain Energy**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2009.

HARTEL, P. L. **Desenvolvimento de um novo processo para produção de biodiesel etílico de mamona**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22. p. 475 – 477, 1973.

HERRERO, M.; MARTIN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J. A. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417–423, 2005.

HOEKMAN, S.; BROCH, A.; ROBBINS, C.; CENICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. Renewable and Sustainable. **Energy Reviews**, v. 16, p.143-169, 2012.

HUNDT, K.; REDDY, B. V. Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 6, p. 294-298, 2011.

HU, Q, et al. Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Câmara Brasileira do Livro-SP, 3ª Edição, Vol. 1. São Paulo, 1985.

JAMES, G. O. et al. Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3343–3351, 2011.

JAMES, G. O.; HOCART, C. H.; HILLIER, W.; PRICE, G. D.; DJORDJEVIC, M. A. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 50–59, 2013.

JOCHMANN, A. **Extração supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*)**. Florianópolis, 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, UFSC, 2000.

KHAN, S. A.; RASHMI; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S. BANERJEE, U. C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2361–2372, 2009.

KOLA, H.; WILKINSON, K. J. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. **Environ Sci Technol**, v. 39, p. 3040-3047, 2005.

KOWALSKI, S. C. **Análise da viabilidade técnica econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel estudo de caso Paranaguá**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia). Universidade Federal do Paraná, Instituto de Engenharia do Paraná, Curitiba, 2010.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C.N.; NAYYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactor for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 4945-4953, 2011.

LATALA, A. Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. **Oceanologia**, v. 31, n. 1991, p. 119–138, nov. 1991.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

LEE, Y. E SHEN, H. Basic culturing techniques. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology**, pp. 40-56, 2004.

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**, v. 43, p. 107–116, 2000.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Biotechnol. Lett**, v. 31, 2009.

LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4717-4722, 2008.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, Salvador, v. 32, p. 1596-1608, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2006.

LOURENÇO, S. O.; CAMPOS, V. B.; BARABARINO, E. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.

LUQUE, R. et al. Biofuels: a technological perspective. **Energy and Environmental Science**, v. 1, n. 5, p. 542-564, 2008.

MA, F.; HANNA, A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, p. 1-15, 1999.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 18- 27 2009.

MARÍN-NAVARRO, J.; ESQUIVEL, M.G.; MORENO, J. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* revisited: Rubisco as a biotechnological target. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1785-1793, 2010.

MARTINS A. A. **Estudo da influência de parâmetros ambientais (Fe e N) na produtividade lipídica da microalga *Chlamydomonas* sp.** 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2012.

MARTINS, G. V. **Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas fitoplanctônicas.** 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

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

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Chemistry**, p.1357–1367, 2007.

- MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, China, p. 1-5, 2009.
- MERCHANT, S. S. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. **Science**, v. 318, p. 245-251, 2007.
- MIAO, X.; WU, Q. Production of biodiesel from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, China, v. 97, p. 841-846, 2006.
- MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 27-36, 2007.
- MOLINA GRIMA. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, 2003, v. 20, p. 491-515, 2003.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de Ácidos Graxos de Micro algas Cultivadas com Dióxido de Carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, 2008.
- MOROWVAT, M. H.; RASOUL-AMINI, S.; GHASEMI, Y. *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2059-2062, 2010.
- MSANNE, J. et al. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Phytochemistry**, v. 75, p. 50–59, 2012.
- NASCIMENTO, I. A. et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NEVES, V.A.; SILVA, M.A.; LOURENÇO, E.J. Caracterização e hidrólise *in vitro* da globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), var. IAC–Marrocos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, jan./mar. 2004.
- NICHOLS, H. W.; BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. nov. et sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, p. 34-38, 1965.
- OH, H. M.; LEE, S. J.; YOON, B. D. Rapid method for determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Technology**, v.12, p. 553, 1998.
- OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA**, v. 36, n. 36, p. 39–73, 2007.

OIL PRODUCTION. Disponível:<<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm>, Acesso em:05 mai. 2016.

OLIVEIRA, O. S. B. C. **Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis**. 2009. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa., 2009.

OSTA, M. A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; KAFATOS, F. C. Effects of mosquito genes on Plasmodium development. **Science**, v. 303, n. 4, p. 427-439, 2007.

PÉREZ, H. E. B. **Biodiesel de Microalgas**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1-19, 2007.

PEQUENO, M. A. G.; SOARES, A. T.; SASSI, K. K. B.; SILVA, D. D.; SOUZA, A. G. Avaliação do potencial do óleo da microalga cultivada *Chlorella sp.* por cromatografia gasosa. **Revista Analytica**, Paraíba. v. 57, p. 23-32, 2012.

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

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indic Econ**, FEE, Porto Alegre, v. 30, n. 2, p. 179-190, set, 2002.

PRUVOST, J, VOOREN, G. V, GOUIC, B, COUZINET-MOSSION, A.; LEGRAND, J. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. **Bioresource Technology**, v. 102, n. , p. 150-158, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.

RAGNI, M.; AIRS, R. L.; LEONARDOS, N.; GEIDER, R. J.. Commercial applications of microalgae. **J. Phycol.** v. 44, p. 670, 2008.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, A; Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, 2009, v. 100, p. 261-268, 2009.

RAS, M.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 153-164, 2013.

RAVEN, J. A. **Limits to growth**. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). *Microalgal Biotechnology*, Cambridge: Cambridge University, p.331-356. 1988.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Mass Cultures**; Richmond A., ed; CRC: Boca Raton, 1986.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: C.R.C. Press. ISBN 0-8493-3240-0,1990.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology**. Cornwall: Blackwell Science Ltda. ISBN 0-632-05953-2. 566 p. 2004

RYCKEBOSCH, E.; MUYLEAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 189-198, 2012.

SAHENA, F. et al.; Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. **Journal of Food Engineering**. v. 15, p.240–253, 2009.

SANDNES, J. M.; KÄLLQVIST, T.; WENNER, D.; GISLERØD, H. R. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: Linking cellular responses to large-scale biomass production. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 515–525, 2005.

SANCHEZA, E. et al. Biodiesel from microalgae oil production in two sequential. **Chemical Engineering**, p. 211-216, 2011.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M.. Influencia do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 17–21, 2003.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **J. Energy**, v. 35, p. 291– 311, 2011.

SCHMDT, C. W. Biodiesel: Cultivating Alternative Fuels. **Environmental Health Perspect**, v. 115, n. 2, p. 86-91, 2007.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SHEEHAN, J. et al. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae**. 328p. July 1998.

SILVA, F. C.; PEREIRA, A.; CANOZZI, M. B.; ARAÚJO, S. C. **Cultivo de microalgas marinhas**. In: POLI, C. R. et al. (orgs.). *Aqüicultura: experiências brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa, 2003. p. 93-120, 2003.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Porto Alegre, v.38, n.3, p.843-851, 2008.

SPECTOR, G. et al. **Cultivo de Microalgas para sequestro de CO₂**, 2008. In. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Recife – PE.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p.87-96, 2006.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.

TABATABAEIA, M. et al. Biodiesel production from genetically engineered microalgae:Future of bioenergy in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Review**, p. 1918-1927, 2011.

TAMBURIC, B. et al. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7872-7876, 2011.

TEIXEIRA, C. M. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel**. Disponível em: www.biodiesel.gov.br/congresso2006. Acesso em: 21 jul. 2016.

TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.178-214.

TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Liquid Fuel Production Using Microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 48, n. 5, p. 251–259, 2005.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. **Photosynthetica**, v. 45, n. 2, p. 309-311, 2007.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ-CEBRERO, F.; Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone Tlss) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium, **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 207–216, 2002.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A. Microalgae as Source of Biofuel, Food, Fodder and Medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n.9, p. 789-807, 2011.

VIEIRA, S. S. **Produção de biodiesel via esterificação de ácidos graxos livres utilizando catalisadores heterogêneos ácidos**. 2011. 117 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

VILELA, H. D. M. **Bioquímica em *Chlamydomonas reinhardtii* Visando o Aumento da Produção de Lipídeos para obtenção de Biocombustível**. 2014. 139 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VIROT, M. et al. Microwave-integrated extraction of total fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 57, p. 33-41, 2008.

VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B., 2006, **Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação**, Ed. Varela, São Paulo, 120p.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

XU, X.; GAO, Y.; LIU, G.; WANG, Q.; ZHAO, J. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae thamnoides* L.) oil using response surface methodology. **Food Science Technology**, p.1223–1231, 2008.

XU, L. et al.. Improved algal oil production from *Botryococcus braunii* by feeding nitrate and phosphate in an airlift bioreactor. **Eng. Life Sci.**, v. 12, n. 2, p.171 – 177, 2012.

WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M., SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2724–2730, 2011.

WANG, X.; ZHANG, X. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v.126, p. 307-313, 2012.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, I. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 13-20, 2009.