

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *POTERIOCHROMONAS*
***MALHAMENSIS*, VISANDO À PRODUÇÃO DE BIODIESEL PELA REAÇÃO**
DE TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU*

TAYSA DE SOUZA BRANIZ

TOLEDO – PARANÁ

2023

TAYSA DE SOUZA BRANIZ

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *POTERIOCHROMONAS MALHAMENSIS*, VISANDO À PRODUÇÃO DE BIODIESEL PELA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU*

Versão para a defesa apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos necessários a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração em desenvolvimento de bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes

Co-orientador: Prof.^a Dr^a Daniela Estelita Goes Trigueros

TOLEDO – PARANÁ

2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Braniz, Taysa de Souza

Extração de lipídios da microalga *Poteroiochromonas malhamensis*, visando à produção de biodiesel pela reação de transesterificação in situ / Taysa de Souza Braniz; orientador Aparecido Nivaldo Módenes ; coorientadora Daniela Estelita Goes Trigueros. -- Toledo, 2023.
187 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2023.

1. Microalgas. 2. Biodiesel. 3. reação in situ. 4. fotobioreatores. I. Nivaldo Módenes , Aparecido , orient. II. Estelita Goes Trigueros, Daniela , coorient. III. Título.

*“Há uma força motriz mais poderosa
que o vapor, a eletricidade e a
energia atômica: a vontade.”*

- Albert Einstein

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA *POTERIOCHROMONAS MALHAMENSIS*, VISANDO À PRODUÇÃO DE BODIESEL PELA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU*

AUTOR: TAYSA DE SOUZA BRANIZ

ORIENTADOR: DR. APARECIDO NIVALDO MÓDENES

CO-ORIENTADORA: DR^a DANIELA ESTELITA GOES TRIGUEROS

Defesa de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua da Faculdade, n° 645 - Jardim Santa Maria - Bloco E, Caixa postal 520 - CEP: 85903-000 - Toledo PR – Brasil,

RESUMO

Devido ao aumento populacional e à rápida industrialização, ocorreu um aumento significativo no uso de derivados de petróleo. Na mesma rapidez que se deu o uso de combustíveis fósseis, aumentou também o conhecimento sobre os impactos ambientais que eles geravam, como por exemplo, o aquecimento global e as chuvas ácidas. Além da questão ambiental, esses combustíveis são limitados e com previsão de esgotamento. Desse modo, a busca por fontes alternativas de energia é extremamente importante. Nesse contexto, independente da alternativa a ser adotada é de fundamental importância aumentar a participação das fontes renováveis e ambientalmente limpas, podendo-se destacar o biodiesel. A busca por novas matérias-primas para a produção de biodiesel tem sido destaque durante os últimos anos, sendo as microalgas consideradas potencialmente úteis para esse processo. Esses microrganismos fotossintetizantes utilizam energia solar associada com água e gás carbônico para produzir biomassa, capaz de ser transformada em energias disponíveis, como na forma de biodiesel. Desta forma, foi estudado o cultivo de microalgas da espécie *Poteriochromonas malhamensis* em meio M-8 modificado, utilizando cultivos com e sem suplementação de micronutrientes em um reator de placas planas de 10 L a uma vazão de dióxidos de carbono de 8%. Foi quantificado a quantidade de clorofila *a* e *b* e carotenoides pelo métodos UV-VIS utilizando metanol como solvente, e foram testadas diferentes técnicas com diferentes solventes na obtenção de lipídios brutos. Em seguida, foi elaborado um planejamento experimental Box-Behnken, com 3 níveis e 3 fatores (temperatura e quantidade de catalisador e solvente), para se obter a

maior quantidade de biodiesel e de ácidos graxos utilizando a biomassa seca resultante do cultivo. Como resultado, foi obtido um cultivo de ultra alta densidade com aproximadamente $17,50 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa, $191,837 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila *a*, $230,285 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila *b* e $34,938 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de carotenoides com a suplementação de micronutrientes. O rendimento lipídico obteve o melhor resultado utilizando a técnica com o soxhlet com $12,642 \text{ g}$ de lipídios por g de biomassa, contudo a utilização da extração por fluido supercrítico obteve um melhor resultado na composição dos ésteres, com uma maior quantidade de ácidos saturados. No processo de transesterificação *in situ* houve uma pequena diferença no rendimento quando utilizado o solvente metanol e etanol, porém quando analisado o FAME, o álcool metílico alcançou o maior rendimento a 65°C no tempo de 240 minutos com $5,8 \text{ g}$ de ésteres por g de biomassa seca. No planejamento experimental para o biodiesel, obteve como melhor rendimento nos parâmetros de 90°C , $0,45 \text{ mL}$ de HCl e $0,25 \text{ mL}$ de solvente metanol, obtendo um rendimento de 22 g de biodiesel por g de biomassa seca. Contudo, para o planejamento experimental com resposta em FAME obtivemos os pontos centrais como melhores valores de catalisador, volume de solvente e temperatura ($0,25 \text{ mL}$; $2,5 \text{ mL}$ e 65°C).

Palavra-chave: Microalgas, biodiesel, reação *in situ* e fotobioreatores.

EXTRACTION OF LIPIDS FROM THE MICROALGA *POTERIOCHROMONAS MALHAMENSIS*, AIMING AT BIODIESEL PRODUCTION THROUGH *IN SITU* TRANSESTERIFICATION

AUTHOR: TAYSA DE SOUZA BRANIZ

SUPERVISOR: DR. APARECIDO NIVALDO MÓDENES

CO-SUPERVISOR: DR^a DANIELA ESTELITA GOES TRIGUEROS

Doctoral Defense; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Western Paraná. Faculdade Street, No. 645 - Jardim Santa Maria - Block E, P.O. Box 520 - ZIP Code: 85903-000 - Toledo PR – Brazil,

ABSTRACT

Due to population growth and rapid industrialization, there has been a significant increase in the use of petroleum derivatives. Alongside the rapid adoption of fossil fuels, there has also been a heightened awareness of the environmental impacts they generate, such as global warming and acid rain. In addition to environmental concerns, these fuels are finite and projected to deplete. Thus, the quest for alternative energy sources is paramount. In this context, regardless of the alternative adopted, it is crucial to increase the contribution of renewable and environmentally friendly sources, with biodiesel standing out. The search for new raw materials for biodiesel production has been prominent in recent years, with microalgae considered potentially useful for this process. These photosynthetic microorganisms utilize solar energy, along with water and carbon dioxide, to produce biomass capable of being converted into available energies, such as biodiesel. Consequently, the cultivation of microalgae of the species *Poteriochromonas malhamensis* was studied in a modified M-8 medium, with cultures conducted both with and without micronutrient supplementation in a 10 L flat-plate reactor at a carbon dioxide flow rate of 8%. The quantities of chlorophyll *a* and *b*, as well as carotenoids, were quantified using UV-VIS methods with methanol as the solvent. Various techniques with different solvents were tested for the extraction of crude lipids. Subsequently, a Box-Behnken experimental design, encompassing three levels and three factors (temperature, catalyst quantity, and solvent), was employed to maximize the yield of biodiesel and fatty acids from the resultant dry biomass obtained from the cultivation process. As a result, an

ultra-high-density culture was achieved, with approximately 17.50 gL⁻¹ of biomass, 191.837 µg mL⁻¹ of chlorophyll *a*, 230.285 µg mL⁻¹ of chlorophyll *b*, and 34.938 µg mL⁻¹ of carotenoids with micronutrient supplementation. The lipid yield obtained the best result using the soxhlet technique, with 12.642 g of lipids per g of biomass. However, the utilization of supercritical fluid extraction yielded better results in terms of ester composition, with a higher quantity of saturated acids. In the *in situ* transesterification process, there was a slight difference in yield when using methanol and ethanol as solvents. Still, methanol achieved the highest yield in terms of FAME (fatty acid methyl esters) at 65°C for 240 minutes, with 5.8 g of esters per g of dry biomass. In the experimental design for biodiesel production, the optimum parameters were found to be 90°C, 0.45 mL of HCl, and 0.25 mL of methanol solvent, yielding 22 g of biodiesel per g of dry biomass. However, for the experimental design targeting FAME, the central points were identified as the optimal values for catalyst, solvent volume, and temperature (0.25 mL, 2.5 mL, and 65°C, respectively).

Keyword: microalgae, biodiesel, in situ reaction and photobioreactors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação da <i>Poterioochromonas malhamensis</i>	7
FIGURA 2 - <i>P. malhamensis</i> em processo de ingestão e digestão da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	8
FIGURA 3 - Resumo das reações no processo de Fotossíntese.....	9
FIGURA 4 - Cloroplasto. (a) Diagrama esquemático. (b) Micrografia eletrônica em alto aumento.	10
FIGURA 5 - Absorção de luz visível por fotopigmentos.....	11
FIGURA 6 - Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos.	12
FIGURA 7- Ciclo de Calvin-Benson.	13
FIGURA 8 - Exigências de luz, carbono inorgânico e carbono orgânico para o cultivo fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico de microalgas.	14
FIGURA 9 - Extrator Soxhlet.....	34
FIGURA 10 - Linha do Tempo dos percentuais de adição de biodiesel para formulação do diesel B.	43
FIGURA 11 - Etapas no processo de transesterificação de triacilglicerídeos.....	45
FIGURA 12 – Configuração experimental onde: (A) é o cilindro de CO ₂ comprimido; (B) é o compressor de ar isento de óleo; (C) é o filtro bacteriológico triplo; (D) são os medidores de fluxo; (E) são as linhas de gás que alimentam os PBRs; (F) é o esquema de luz; e C1 e C2 são as câmaras de iluminação.	60
FIGURA 13- Perfis de varredura da absorbância para determinadas concentrações.....	76
FIGURA 14 – Curva de regressão entre a concentração da biomassa (g L ⁻¹) e a absorbância no comprimento de onda em 687 nm.	77
FIGURA 15 - Crescimento celular da <i>Poterioochromonas malhamensis</i> (g L ⁻¹) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.	78
FIGURA 16 – Teste de Tukey para a concentração de <i>P.malhamensis</i> com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.....	79
FIGURA 17 - Teor de Clorofila a (µg mL ⁻¹) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.....	82

FIGURA 18 - Teste de Tukey para a teor de clorofila a em um cultivo com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.....	83
FIGURA 19 - Teor de Clorofila b ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.....	84
FIGURA 20 - Teste de Tukey para a teor de clorofila b em um cultivo com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.....	85
FIGURA 21 - Teor de carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.....	86
FIGURA 22 - Teste de Tukey para teor de carotenoides em um cultivo com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.....	87
FIGURA 23 - Rendimento em lipídios ($\text{g}_{\text{lipídios totais}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.	88
FIGURA 24 - Teste de Tukey para o rendimento em lipídios ($\text{g}_{\text{lipídios totais}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) cultivado com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.....	90
FIGURA 25 - Rendimento em proteínas ($\text{g}_{\text{proteína bruta}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo com suplementação de micronutrientes.....	92
FIGURA 26 - Teste de Tukey para o rendimento em proteína bruta ($\text{g}_{\text{proteína bruta}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) cultivado com suplementação de micronutrientes em função do tempo.	93
FIGURA 27- Rendimentos de lipídeos extraídos (%) utilizando técnicas diferentes de extração, onde não há o uso de temperatura maiores que 25°C e teste de Tukey.	97
FIGURA 28 - Perfil de ácidos graxos da <i>Poteriochromonas malhamensis</i> obtido por diferentes métodos de extração a 25°C	98
FIGURA 29 - Composição dos ácidos graxos da <i>Poteriochromonas malhamensis</i> a 25°C utilizando técnicas diferentes de extrações.....	99
FIGURA 30 - Rendimentos de lipídeos (%) extraídos via soxhlet e extração sucessiva com os solventes hexano, diclorometano, etanol, éter etílico e a mistura clorofórmio e metanol. Teste de Tukey representado pelas letras.	101
FIGURA 31 - Perfil de ácidos graxos da <i>Poteriochromonas malhamensis</i> obtido pelos métodos de extração sucessiva (B) e via soxhlet (A).	102
FIGURA 32 - Composição dos ácidos graxos da <i>Poteriochromonas malhamensis</i> utilizando a extração sucessiva e a extração com o soxhlet em diferentes solventes.....	102

- FIGURA 33 - Rendimento em lipídios da extração supercrítica para temperatura de 50°C e pressão de 25MPa..... 104
- FIGURA 34 - Rendimento lipídico na extração supercrítica variando a pressão e a temperatura do sistema, com a utilização de 5% de etanol como cossolvente..... 104
- FIGURA 35- Perfil de ácidos graxos para extrações supercríticas com CO₂no tempo de 150 minutos com adição de 5% de etanol como cossolvente..... 105
- FIGURA 36 - Composição dos ácidos graxos da *Poterioochromonas malhamensis* utilizando a extração supercrítica com CO₂ e 5% de etanol como cossolvente no tempo de 150 minutos. 106
- FIGURA 37 - Reação de transesterificação *in situ* variando o solvente (metanol e etanol) usado na proporção em volume de 10:1:1 (solvente:catalisador:cossolvente), em 65°C; a) Rendimento em biodiesel; b) Rendimento os ésteres de ácidos graxos pela biomassa seca. 107
- FIGURA 38 - Rendimento em conversão de ésteres de ácidos graxos na transesterificação *in situ* usado na proporção em volume de 10:1:1 (solvente:catalisador:cossolvente), em 65°C..... 110
- FIGURA 39 - Reação de transesterificação *in situ* alterando teor de água na biomassa. Proporção utilizada 10:1:1 (Metanol:HCl:Clorofórmio), em 65°C a) Rendimento em biodiesel; b) Rendimento os ésteres de ácidos graxos..... 111
- FIGURA 40 - Reação de transesterificação *in situ* alterando o teor de cossolvente. Proporção em volume utilizada 10:1:X (Metanol:HCl:Clorofórmio), em 65°C, por 4 horas; a) rendimento biodiesel por biomassa seca; b) rendimento ésteres metílicos por biomassa seca. 114
- FIGURA 41 -Pareto dos efeitos linear (q_i), quadrático (q_i^2) e de interações ($q_i:q_j$) das variáveis independentes: temperatura (q_1 ; °C), quantidade de catalisador (q_2 ; volume) e quantidade de solvente (q_3 ; volume) sobre o rendimento em biodiesel % ($g_{biodiesel} g_{biomassa}^{-1}$) na transesterificação direta utilizando a *P. malhamensis*. 118
- FIGURA 42 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste do modelo aos dados rendimento em biodiesel: (a) Correlação entre os valores preditos e observados; (b) Homoscedasticidade dos resíduos versus valores preditos pelo modelo; (c) Independência dos resíduos versus ensaio experimental; d) Normalidade dos resíduos..... 120
- FIGURA 43 - Superfícies de resposta dos resultados experimentais obtidos no planejamento Box-Behnken para rendimento em biodiesel quando (a) volume do solvente (metanol) fixado em 2,5 mL (b) volume do catalisador (HCl) fixado em 0,25 mL (c) temperatura fixada em 65°C..... 121

FIGURA 44 - Pareto dos efeitos linear (q_i), quadrático (q_i^2) e de interações ($q_i:q_j$) das variáveis independentes: temperatura (q_1 ; °C), quantidade de catalisador (q_2 ; volume) e quantidade de solvente (q_3 ; volume) sobre o rendimento em FAME % ($\text{g ésteres g biomassa}^{-1}$) na transesterificação direta utilizando a *P. malhamensis*. 123

FIGURA 45 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste do modelo aos dados rendimento em FAME: (a) Correlação entre os valores preditos e observados; (b) Homoscedasticidade dos resíduos versus valores preditos pelo modelo; (c) Independência dos resíduos versus ensaio experimental; (d) Normalidade dos resíduos. 126

FIGURA 46 - Superfícies de resposta dos resultados experimentais obtidos no planejamento Box-Behnken para rendimento em biodiesel quando (a) volume do solvente (metanol) fixado em 2,5 mL (b) volume do catalisador (HCl) fixado em 0,25 mL (c) temperatura fixada em 65°C. 127

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparação do potencial do óleo de microalgas com outras matérias-primas.	26
TABELA 2- Conteúdo lipídico e perfil de ésteres metílicos de ácidos Graxos (FAME) de diferentes espécies de microalgas.....	28
TABELA 3 - Ácidos graxos saturados de fórmula geral $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$	29
TABELA 4 - Especificações do Biodiesel.	43
TABELA 5 - Composição do meio de cultivo BG-11.	57
TABELA 6 - Composição solução de micronutrientes.	58
TABELA 7 - Composição do meio de cultivo M-8 modificado.	58
TABELA 8 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental	73
TABELA 9 - Reações de transesterificação in situ realizadas por planejamento Box-Behnken.....	74
TABELA 10 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta concentração de biomassa estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.	79
TABELA 11 - Taxa de crescimento específico e produtividade para o cultivo da <i>P. malhamensis</i> durante 21 dias com e sem suplementação de micronutrientes	81
TABELA 12 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta clorofila <i>a</i> estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.	83
TABELA 13 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta clorofila <i>b</i> estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.	85
TABELA 14 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta carotenoides estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.	86
TABELA 15 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta lipídios totais estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.	88
TABELA 16 - Produtividade lipídica volumétrica.....	90

TABELA 17 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta proteína bruta estimada em cultivos de microalgas com suplementação de micronutrientes.	92
TABELA 18 - Composição Química no 25° dia de cultivo da microalga <i>P. malhamensis</i>	94
TABELA 19 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único método de extração sem aquecimento para a variável resposta rendimento em lipídios totais.	95
TABELA 20 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único método de extração com elevação de temperatura para a variável resposta rendimento em lipídios totais.....	100
TABELA 21 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único para transesterificação <i>in situ</i> utilizando o metanol e o etanol, sendo a variável resposta rendimento em biodiesel % ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).	108
TABELA 22 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em Biodiesel % ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação <i>in situ</i> para metanol e etanol, nas condições: 65°C, na proporção em volume de 10:1:1 (etanol ou metanol:HCl:clorofórmio).....	108
TABELA 23 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único para transesterificação <i>in situ</i> utilizando o metanol e o etanol, sendo a variável resposta rendimento em ésteres de ácidos graxos % ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).	109
TABELA 24 -Teste de Tukey para variável resposta rendimento em ésteres de ácidos graxos % ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação <i>in situ</i> para metanol e etanol, nas condições: 65°C, na proporção em vol. 10:1:1 (etanol ou metanol:HCl:Clorofórmio).	109
TABELA 25 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em biodiesel por biomassa seca % ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação <i>in situ</i> para variação no teor de água, nas condições: 65°C, 10:1:1 (metanol:HCl:Clorofórmio), no tempo de 4 horas.	112
TABELA 26 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em ésteres de ácidos graxos por biomassa seca % ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação <i>in situ</i> para variação no teor de água, nas condições: 65°C, na proporção em volume de 10:1:1 (metanol:HCl:Clorofórmio), no tempo de 4 horas.	113
TABELA 27 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único para transesterificação <i>in situ</i> utilizando variação no teor de cossolvente, sendo a variável resposta rendimento em biodiesel.	113
TABELA 28 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em Biodiesel % na reação de transesterificação <i>in situ</i> para variação nos teores de cossolvente nas condições: 65°C, proporção em volume de 10:1 (Metanol:HCl) e tempo de 4 horas.	114

TABELA 29 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em ésteres metílicos na reação de transesterificação *in situ* para variação nos teores de cossolvente nas condições: 65°C, proporção em volume de 10:1 (metanol:HCl) e tempo de 4 horas. 115

TABELA 30 - Condições experimentais e resultados do rendimento em biodiesel para as reações de transesterificação *in situ* com a *P. malhamensis*..... 116

TABELA 31 - ANOVA das fontes de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados rendimento em biodiesel obtidos na transesterificação direta da microalga *P. malhamensis*. 119

TABELA 32 - ANOVA das fontes de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados rendimento em FAME obtidos na transesterificação *in situ*. 124

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.2 OBJETIVO GERAL	2
1.2.1 <i>Objetivos específicos</i>	2
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1 MICROALGAS	4
2.1.1 <i>Classificação</i>	5
2.1.2 <i>Poteroochromonas malhamensis</i>	6
2.1.3 <i>Fotossíntese oxigênica</i>	8
2.1.3.1 <i>Reações luminosas</i>	10
2.1.3.2 <i>Reações de fixação de carbono</i>	12
2.2 METABOLISMO CELULAR	13
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	14
2.3.1 <i>Luminosidade</i>	15
2.3.2 <i>Temperatura</i>	16
2.3.3 <i>pH</i>	17
2.3.4 <i>Agitação (Aeração)</i>	18
2.3.5 <i>Composição nutricional do meio de cultivo</i>	19
2.4 SISTEMAS DE CULTIVO	20
2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA ALGAL	21
2.5.1 <i>Coleta da biomassa</i>	22
2.5.1.1 <i>Métodos químicos</i>	22
2.5.1.2 <i>Métodos físicos</i>	23
2.5.1.3 <i>Métodos biológicos</i>	24
2.5.1.4 <i>Métodos magnéticos</i>	24
2.5.2 <i>Secagem</i>	24
2.6 LIPÍDIOS	25
2.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS	30
2.7.1 <i>Campo elétrico pulsado</i>	30
2.7.2 <i>Ultrassom</i>	30
2.7.3 <i>Micro-ondas</i>	31
2.7.4 <i>Extração por fluido supercrítico</i>	31

2.7.5 <i>Extração por solventes orgânicos</i>	32
2.7.5.1 Método de Folch	32
2.7.5.2 Método de Bligh e Dyer	33
2.7.5.3 Método de Soxhlet.....	33
2.8 PRODUTOS E APLICAÇÕES DAS MICROALGAS	34
2.8.1 <i>Aplicações farmacêutica, cosméticos e alimentar</i>	34
2.8.1.1 Ácidos graxos poli-insaturados	35
2.8.1.2 Clorofila.....	35
2.8.1.3 Carotenoides	36
2.8.1.4 Betacaroteno	36
2.8.1.5 Astaxantina	36
2.8.1.6 Fucoxantina	36
2.8.1.7 Pigmentos de proteção solar e proteção UV.....	37
2.8.2 <i>Aplicações na agropecuária</i>	37
2.8.2.1 Biofertilizantes	37
2.8.2.2 Nutrição animal	38
2.8.3 <i>Aplicações como fonte de energia renovável</i>	38
2.8.3.1 Bio-óleo	38
2.8.3.2 Biometano.....	39
2.8.3.3 Bioetanol.....	39
2.8.3.4 Biobutanol	39
2.8.4 <i>Aplicações Ambientais</i>	40
2.8.4.1 Fixação de CO ₂	40
2.8.4.2. Tratamento de efluentes.....	40
2.9 BIOCOMBUSTÍVEIS	40
2.9.1 <i>Biodiesel</i>	42
2.9.2 <i>Transesterificação</i>	44
2.9.3 <i>Transesterificação in situ</i>	45
2.9.4 <i>Principais fatores que influenciam a reação de transesterificação in situ</i>	45
CAPÍTULO 3 – ESTADO DA ARTE	48
3.1 CULTIVO MICROALGAS	48
3.2 LIPÍDIOS DE MICROALGAS	50
3.3 BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS.....	52
3.3.1 <i>Indireta</i>	52

3.3.2 Direta (<i>in situ</i>).....	54
3.3.3 Supercrítica.....	55
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 CULTIVO.....	57
4.1.1 Meios de cultivo.....	57
4.1.2 Manutenção das células.....	58
4.1.3 Cultivo de ativação.....	59
4.1.4 Cultivo em reatores de coluna.....	59
4.1.5 Cultivo em reator de placa plana.....	60
4.1.6 Controle das condições de cultivo.....	61
4.1.7 Recuperação da biomassa microalgal.....	61
4.2 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....	61
4.2.1 Obtenção da concentração celular.....	61
4.2.2 Taxa de Crescimento Específico.....	62
4.2.3 Produtividade.....	62
4.3 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS QUE COMPÕEM A BIOMASSA.....	63
4.3.1 Umidade e matéria seca.....	63
4.3.2 Teor de cinzas.....	63
4.3.3 Clorofilas e carotenoides totais.....	64
4.3.4 Proteínas brutas.....	65
4.3.5 Fibras brutas.....	66
4.3.6 Carboidratos totais.....	67
4.4 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS.....	67
4.4.1 Método Bligh e Dyer (2:2:1,8) – BD1.....	67
4.4.2 Método Bligh e Dyer (2:2:1,8) com ultrassom – BD1-ULTRA.....	68
4.4.3 Método Bligh e Dyer (2:2:1) – BD2.....	68
4.4.4 Método Bligh e Dyer (5,7:3:1) – BD3.....	68
4.4.5 Método Bligh e Dyer (5,7:3:1) com ultrassom – BD3-ULTRA.....	69
4.4.6 Método Hara e Radin – HRI.....	69
4.4.7 Método Hara e Radin modificado – HRI-MOD.....	69
4.4.8 Método Fajardo e colaboradores – FAJARDO.....	69
4.4.9 Método Folch e colaboradores – FOLCH.....	69
4.4.10 Método Chen e colaboradores – FOLCH-MOD.....	70
4.4.11 Método soxhlet.....	70

4.4.12 Método extração sucessiva.....	70
4.4.13 Método extração supercrítica	71
4.4.14 Análise dos ésteres de ácidos graxos das extrações	71
4.5 BIODIESEL.....	72
4.5.1 Reação de transesterificação <i>in situ</i>	72
4.5.2 Planejamento experimental.....	73
4.5.3 Análise dos ésteres de ácidos graxos	74
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS	76
5.1 OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	76
5.2 SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.....	77
5.3 SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS	81
5.3.1 <i>Clorofila a</i>	81
5.3.2 <i>Clorofila b</i>	83
5.3.3 <i>Carotenoides</i>	85
5.4 SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE LÍPIDIOS.....	87
5.5 PERFIL DIÁRIO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS BRUTAS	91
5.6 CARACTERIZAÇÃO GERAL.....	93
5.7 EXTRAÇÃO DE LÍPIDIOS	94
5.7.1 <i>Extração a frio</i>	95
5.7.2 <i>Extração a quente</i>	99
5.7.3 <i>Extração supercrítica</i>	103
5.8 TRANSESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	107
5.8.1 <i>Efeito do tipo de álcool e tempo na transesterificação in situ</i>	107
5.8.2 <i>Efeito da umidade da biomassa transesterificação in situ</i>	110
5.8.3 <i>Efeito da quantidade de co-solvente na transesterificação in situ</i>	113
5.8.4 <i>Resultado do planejamento experimental</i>	115
5.8.4.1 Resultados do rendimento em biodiesel	117
5.8.4.2 Resultados do rendimento em FAME	122
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
ANEXO A	164
ANEXO B	165

ANEXO C	166
ANEXO D	167
ANEXO E	168

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Com a eclosão da revolução industrial, gerando a intensificação da industrialização e urbanização dos centros, ocorreu também o impulsionamento nos transportes. Dessa forma, a liberação de certos gases, fizeram com que houvesse um aumento no efeito estufa. Esse aumento faz com que a temperatura da terra se eleve, contribuindo para o incremento dos fenômenos climáticos extremos (tufões e furacões), derretimento das calotas polares, aumento do nível do mar, alteração na distribuição das chuvas, secas regionais, entre outros (OTT, 1995; ESCOBAR *et al.*, 2009). Com o propósito de encontrar soluções para a diminuição/eliminação do CO₂ excedente na atmosfera, pesquisadores do mundo inteiro buscam alternativas para a substituição na utilização dos combustíveis fósseis, uma vez que além do impacto ambiental projeções indicam seu esgotamento nos próximos 50 anos. Nesse cenário surge as fontes de energias limpas e renováveis, sendo os biocombustíveis uma delas (VIAN, 2006; BAJPAI *et al.*, 2009).

Os biocombustíveis podem ser categorizados em primários e secundários. Os biocombustíveis primários são os que utilizam a biomassa inalterada (não processada), como por exemplo lenha, resíduo florestal, gordura animal. Esses biocombustíveis são conhecidos também apenas como biomassa, e usualmente utilizados para aquecimento, cozimento ou eletricidade. Os biocombustíveis produzidos por meio do processamento da biomassa são definidos como secundários, dentre eles estão o carvão, bioetanol, biodiesel e biogás. Dependendo da matéria prima utilizada e de sua tecnologia, os biocombustíveis secundários são divididos em biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração (SINGH & SINGH, 2008).

Os biocombustíveis de terceira geração são aqueles elaborados a partir de algas e ervas daninhas do mar (SHARMA *et al.*, 2019). Os biocombustíveis e bioprodutos produzidos a base de microalgas possuem grande potencial para a substituição dos combustíveis fósseis e, portanto, têm futuro promissor devido à produção de energia verde sustentável. Estima-se que as microalgas mais eficientes cultivadas em foto-biorreatores otimizados podem produzir 19.000 a 57.000 litros de óleo de algas por acre por ano (DEMIRBAS, 2010). Outra vantagem da cultura de microalgas, é poder ser cultivada em áreas inadequadas para o cultivo dos biocombustíveis de primeira e segunda geração, como

por exemplo esgotos e águas residuais, minimizando os impactos e competições no uso da água doce e das terras aráveis, a não concorrência com a alimentação, aproveitamento dos coprodutos para a alimentação animal e utilização como fertilizantes. Porém, a desvantagem é seu alto custo operacional (SOH & ZIMMERMAN, 2011; SHARMA *et al.*, 2019).

Nesse contexto, é de extrema importância encontrar um método de extração do óleo das microalgas que seja confiável, reproduzível, de baixo valor, objetivando a produção de lipídios em ampla escala para que posteriormente sejam utilizados no preparo do biodiesel (DU *et al.*, 2015). Além do método convencional de transesterificação do óleo extraído, há poucos estudos na literatura relacionados ao uso de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel utilizando extração em estágio único (*in situ*) (NAUTIYAL *et al.*, 2014).

As poucas investigações realizadas utilizando a microalga *Poterioochromonas malhamensis* envolvem sua ação antimicrobiana (SCHUELTER *et al.*, 2019), seu potencial de ultra densidade relacionado a sua biomassa de acordo com o biorreator utilizado (HINTERHOLZ *et al.*, 2019), sua capacidade de pastoreio de outras microalgas (ZHANG & WATANABE, 2001; ZHANG *et al.*, 2008) e sua ação tóxica quando presente em cultivos com a rotífera *Brachionus angularis* (BOXHORN *et al.*, 1998). Logo, não foram encontrados registros da sua exploração em cultivo para a finalidade de extração de bioprodutos e de mesmo modo para o desenvolvimento de biocombustíveis.

1.2 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de crescimento da microalga *Poterioochromonas malhamensis*, analisar técnicas de extração de lipídios e verificar os melhores parâmetros para o processo de transesterificação *in situ* para produção de biodiesel.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento da microalga *Poterioochromonas malhamensis* em reator de 10L de placas planas com meio de cultivo M-8, e os efeitos da adição extra de micronutrientes sob a concentração de biomassa, taxa de crescimento específico e teor de lipídeos e pigmentos com o auxílio da análise de variância – ANOVA, Teste Tukey;

- Caracterizar a biomassa da microalga *Poterochromonas malhamensis*;
- Determinar o melhor processo de extração de lipídios, visando a obtenção da maior quantidade de lipídios totais e ácidos graxos;
- Realizar um planejamento estatístico experimental Box-Behnken Design, considerando-se as variações dos fatores catalisador, temperatura e solvente sobre a transesterificação *in situ*;

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MICROALGAS

A expressão alga na ficologia denomina-se todos os organismos clorofilados que não possuem um talo distinto de folhas, caules e raízes (CROFT *et al.*, 2006; LEE, 2008), esse termo foi apresentado por Lineu em 1753, no seu trabalho titulado *Species plantarum* (BICUDO & MENEZES, 2006). Por não existir essa distinção deixaram de ser classificadas como um sub-reino primitivo no reino das plantas (HUTCHINSON, 1961).

As algas apresentam extrema importância por serem o primeiro elo da cadeia alimentar aquática (FALKOWSKI & RAVEN, 2013). Estima-se que existem cerca de dez milhões de espécies de algas, sendo grande parte microscópicas (GUALTIERI & BARSANTI, 2006; KWIETNIEWSKA *et al.*, 2012). Conforme Oliveira (2013) as microalgas constituem-se essencialmente de lipídios, carboidratos, proteínas e vitaminas.

De acordo com Olaizola (2003) para as algas serem reconhecidas como microalgas elas devem ser microscópicas. Podendo ser do tipo eucariontes (algas verdes ou clorófitas) ou procariontes (algas azuis, cloroxibactérias, cianobactérias ou cianófitas) (TORTORA *et al.*, 2000; BARSANTI *et al.*, 2008). Elas também podem ser classificadas em autotróficas, quando utilizam compostos inorgânicos, e heterotróficas quando utilizam os compostos orgânicos (SCHULZE *et al.*, 2014), e mixotróficas quando utilizam ambos os compostos (NELSON & COX, 2014).

São seres fotossintetizantes que usam a luz solar para a formação de metabolitos (YU *et al.*, 2015). Os fitoplanctônicos produzem 46,2% da fotossíntese realizada anualmente, embora sua biomassa constituí apenas 2% das biomassas capazes de realizar esta operação no planeta (FIELD *et al.*, 1998).

Em razão da presença de clorofila, as microalgas apresentam coloração verde, contudo, com o processo de endossimbiose surgiram outros tipos de algas, com colorações variando do vermelho ao marrom. Isso acontece devido a presença do pigmento xantofila, que se sobrepõe a clorofila dando origem a outras cores (BALDAUF, 2008).

O talo das microalgas é a sua base vital e pode ser encontrado na forma unicelular, colonial, cenobial, filamentoso e sifonoso (GUALTIERI & BARSANTI, 2006). A forma colonial é um agrupamento extremamente estruturado de células distintas que se encontram interligadas. O talo na forma cenóbio detém da mesma quantidade de células

durante toda sua vida. O filamentosos é estruturado por redes de células irmãs unidas pela parede celular, se multiplicando perpendicularmente ao eixo. Já o talo sifonoso é unicelular, multinucleado e constitui um filamento tubular que não dispõe de parede celular transversal (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

Segundo Lubiana (2014) as microalgas podem se desenvolver em solo em combinação com organismos do reino Fungi, além de serem encontradas em ambientes aquático salino e doce. Elas podem apresentar vasta tolerância a alteração de concentração de O₂, CO₂, temperatura, turbidez e radiação (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014). Segundo Lourenço (2006) suas reproduções podem ocorrer de forma sexuada e/ ou assexuada.

2.1.1 Classificação

Woese e colaboradores (1990) classificaram as microalgas em três domínios, Eucarya, Archaea e Bacteria. Elaboraram os domínios utilizando as estruturas e sequências moleculares, visto que, frequentemente são mais reveladores de relações evolutivas do que os fenótipos clássicos, principalmente quando os seres tratados são os microrganismos.

Segundo Pires (2017) atualmente encontra-se vários pesquisadores tentando categorizar as classes das microalgas. Essa classificação está sendo feita de acordo com sua pigmentação, reprodução, estruturas celulares, ciclo de vida, entre outros.

De acordo com Ohse e colaboradores (2007) as microalgas mais importantes podem ser separadas em quatro classes: Diatomáceas, Cianobactérias, algas verdes, algas douradas.

- As Diatomáceas (Bacillariophyceae) possuem coloração entre o marrom e o amarelo, atualmente tem em média 100 mil espécies. São encontradas principalmente nos oceanos, mas podem ser encontradas em água doce e salobra. Possuem paredes impregnadas com sílica polimerizada em sua estrutura, e acumulam carbono na forma de lipídios ou carboidratos.
- As Cianobactérias (Cyanophyceae) são algas que possuem sua organização celular bem próxima as das bactérias e podem ser encontradas em quatro colorações (verde azulada, castanho, violeta e vermelha). Já foram encontradas cerca de 2 mil espécies, sendo elas procarióticas. Acumulam amido e são conhecidas pela sua atuação na fixação do nitrogênio na atmosfera.

- As Algas verdes (Chlorophyceae) são encontradas em água doce, na forma de colônia ou de seres unicelulares. Como estoque de energia produzem amido, contudo podem reservar lipídios também. Sua reprodução ocorre de forma sexuada, esporos assexuados e por divisão binária.
- Algas douradas (Chrysophyceae) também conhecidas como algas pardas, podem ser encontradas na cor marrom, amarelo e laranja. Atualmente são conhecidas por volta de mil espécies sendo a maioria encontradas em água doce. Sua reserva energética é na forma de lipídios e carboidratos.

2.1.2 *Poteriochromonas malhamensis*

A espécie de microalga *Poteriochromonas malhamensis* é um flagelado mixotrófico, caracterizado por desempenhar um papel importante nos ecossistemas planctônicos marinhos e de água doce, executando o pastoreio de bactérias e regenerando nutrientes (SANDERS *et al.*, 1990; ZHANG & WATANABE, 2001), sendo esse pastoreio importante, pois controla o crescimento exacerbado das bactérias (MCKENZIE *et al.*, 1995). Sanders *et al.* (1990) relata ainda que, *Poteriochromonas malhamensis*, fixa apenas 7% do carbono disponível para realização da fotossíntese, sendo o restante obtido do processo heterotrófico, ou seja, da utilização de fonte orgânica com a alimentação de bactérias.

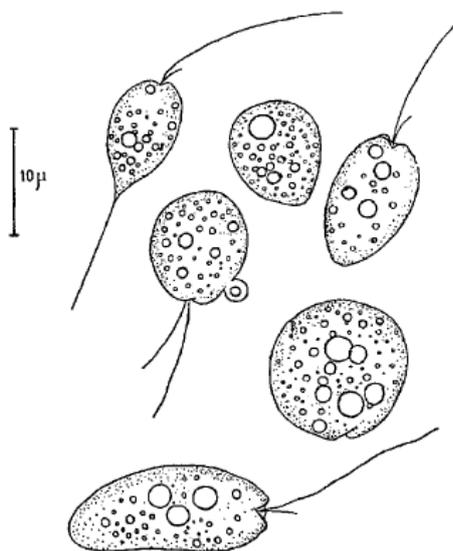
Caracterizada como uma microalga marrom-dourada, também conhecida como *Ochromonas malhamensis*, é unicelular, sem parede celular, que exibe um mecanismo especial de regulação osmótica (DEY & KAUSS, 1981). Os solutos osmóticos fazem com que a célula encolha dentro de 1 a 3 minutos, e nas próximas 1 a 2 horas o volume celular volta ao normal (SCHOBERT *et al.*, 1972).

Possui célula ovoide a esférica, com uma depressão baixa na frente onde os flagelos são inseridos (biflagelada) (Figura 1). Tem apenas um cromatóforo, que consiste em duas partes alongadas conectadas por uma ponte. Pode ser pequeno e desbotado ou grande e marrom dourado (PRINGSHEIM, 1952). Seu tamanho varia entre de 2 a 30 μm , com um flagelo comprido e um flagelo curto, sendo este último protegido por uma carapaça quitinosa, possui também um ou dois cloroplastos e, ocasionalmente, um estigma (ANDERSEN & WETHERBEE, 1992). A reprodução dessas algas é assexuada por divisão celular durante o estágio móvel (BOXHORN *et al.*, 1998), como resultado, as culturas dessa microalga exibem populações com a máxima homogeneidade genética, a

tornando uma boa opção para avaliar os potenciais efeitos biológicos e de saúde de substâncias químicas (RÖDERER, 1986).

Essa linhagem de microalgas possui toxinas capazes de causar danos ao ambiente e a alguns animais (REICH & SPIEGELSTEIN, 1964; HALEVY & AVIVI, 1968). Essa toxicidade foi relatada por Leeper & Porter (1995), quando ao cultivar o crustáceo *Daphnia ambiguaem* juntamente com a *P. malhamensis*, sendo essa cultivada em meio fototrófico e heterotrófico, identificaram que ao utilizar o processo heterotrófico, a microalga, produzia toxinas, tornando o meio impróprio para o cultivo do crustáceo, e quando utilizava o processo fototrófico, a *Daphnia ambiguaem* era capaz de crescer e reproduzir. Hansen (1973) observou que essa toxina impossibilita o crescimento bacteriano.

FIGURA 1 - Representação da *Poterioochromonas malhamensis*.



FONTE: PRINGSHEIM (1952).

Chen e colaboradores (1994) em seus estudos relataram a presença de um antiviral, existente nos extratos obtidos da *P. malhamensis*, sendo possível inibir a PTKpp60, uma proteína que medeia os efeitos de fatores de crescimento e oncogenes na proliferação celular.

Este organismo é capaz de usar várias formas de aquisição de alimentos encontradas em qualquer microrganismo. Partículas orgânicas são rapidamente captadas e digeridas nos vacúolos dos alimentos, utilizando proteína, o amido e a gordura. As mesmas substâncias também são hidrolisadas fora do corpo. O processo de fotossíntese faz com que a *Ochromonas* viva por períodos longos quando em cultura pura, apesar de não ser suficiente

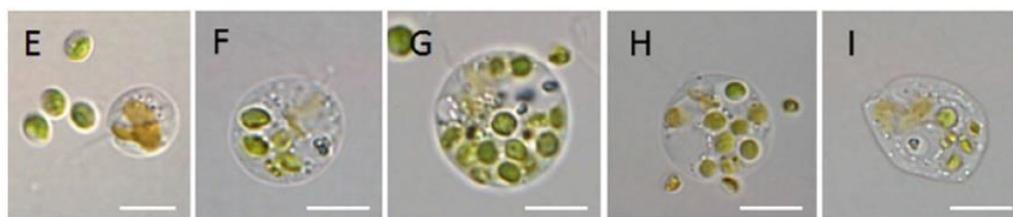
para fornecer todos os compostos orgânicos necessários para a multiplicação (PRINGSHEIM, 1952). Sendo os açúcares altamente favoráveis para o crescimento no claro ou escuro (LUI *et al.*, 1968) e a vitamina B12 sendo uma necessidade absoluta (COATES & FORD, 1955).

Poterioochromonas malhamensis é apta a ingerir vários tipos de organismos, oscilando de pico, nano e microplâncton a algas móveis, englobando as cianobactérias *Synechococcus* e *Microcystis*, o diatomácea *Achnanthes*, a crisomonad *Uroglena* e as algas verdes *Chlorella* e *Carteria*. Ela é capaz de pastar algas duas a três vezes maior que seu próprio diâmetro celular e aumentar em tamanho de 10 a 30 vezes o tamanho de uma célula normal (Figura 2) (ZHANG *et al.*, 1996).

A microalga *P. malhamensis* pode representar uma grande ameaça de contaminação para culturas de algas em massa de *Chlorella* (WANG *et al.*, 2018), sendo considerada como uma das microalgas mais utilizadas comercialmente em virtude da sua alta taxa de crescimento e alto teor de lipídios (MILANO *et al.*, 2016).

Segundo Röderer (1986) a alga unicelular *Poterioochromonas malhamensis* por não possuir parede celular são relativamente frágeis, e geralmente apresentam reações drásticas aos efeitos de agentes tóxicos, alterando sua forma ou até mesmo estourando ou encolhendo, dependendo do tipo de agente tóxico usado. Segundo ele, a morte celular de células morfológicamente intactas é indicada pela perda instantânea de espalhamento de luz e parada do movimento flagelar.

FIGURA 2 - *P. malhamensis* em processo de ingestão e digestão da microalga *Chlorella sorokiniana*.



FONTE: MA *et al.* (2018).

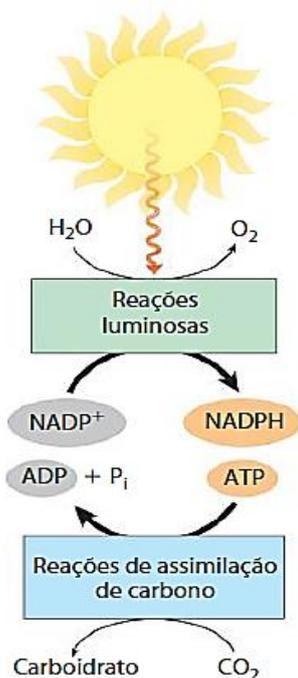
2.1.3 Fotossíntese oxigênica

As microalgas possuem um sistema de fotossíntese extremamente análogo ao das plantas superiores, transformando gás carbônico, água e nutrientes em oxigênio e biomassa, na presença de energia luminosa. Por estarem na maioria das vezes em meio líquido, há

uma facilidade maior nessa transformação quando comparada aos vegetais, visto que os reagentes (CO_2 , H_2O e nutrientes) estão mais acessíveis (LOURENÇO, 2006). Essa prática é chamada de fotossíntese oxigênica (RICHMOND, 2004; BRENNAN & OWENDE, 2010).

A fotossíntese compreende reações diretamente e indiretamente ligadas a luz para a produção de energia e síntese de compostos. As reações metabólicas diretamente ligadas a energia luminosa podem ser nomeadas de fase clara, fotoquímica e reações luminosas. Já as indiretamente ligadas a luz, são chamadas de reações de assimilação de carbono, fixação de carbono ou fase escura, e constituem em reações posteriores as reações da fase luminosa, em outras palavras, necessitam dos subprodutos gerados no decorrer da fase clara (FIGURA 3) (RICHMOND, 2004; PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996; NELSON & COX, 2014).

FIGURA 3 - Resumo das reações no processo de Fotossíntese.

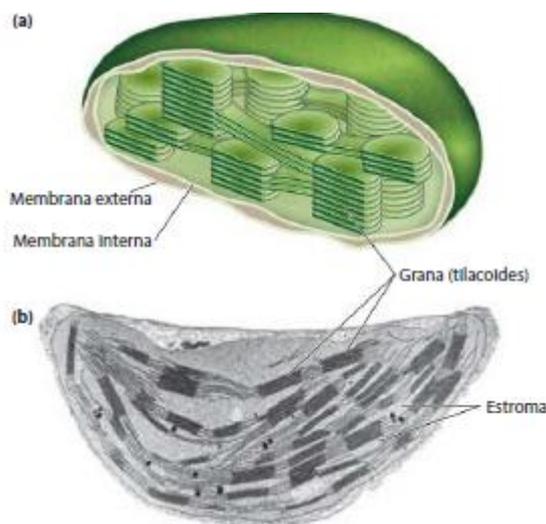


FONTE: NELSON & COX (2014).

Em células eucarióticas fotossintéticas, tanto as reações dependentes de luz quanto as de assimilação de carbono ocorrem nos cloroplastos (Figura 4). Eles são circundados por duas membranas, uma membrana externa e uma interna, sendo que a primeira permeável é às pequenas moléculas e íons. Os tilacoides são um compartimento interno com vários sacos achatados, envolvidos pela membrana interna, normalmente encontra-se empilhados.

Embebidos nas membranas tilacoides estão os pigmentos fotossintéticos e os complexos enzimáticos que realizam as reações luminosas e a síntese de ATP. O estroma (a fase aquosa delimitada pela membrana interna) contém a maioria das enzimas necessárias para as reações de assimilação de carbono (NELSON & COX, 2014).

FIGURA 4 - Cloroplasto. (a) Diagrama esquemático. (b) Micrografia eletrônica em alto aumento.



FONTE: NELSON & COX (2014).

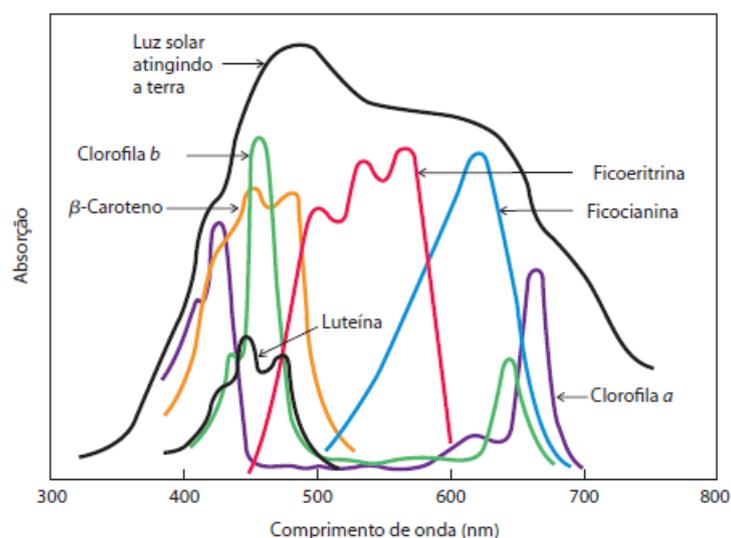
2.1.3.1 Reações luminosas

As membranas dos tilacoides possuem cinco complexos principais: antenas para absorção da luz (LHC I e LHC II); fotossistema I (PS I); fotossistema II (PS II); citocromo b6/f e ATP sintase (RICHMOND, 2004).

Para gerar o redutor bioquímico (NADPH_2) e a energia química (ATP), é necessária energia luminosa, visto que o processo de retirada de dois elétrons da molécula da água, é um processo demasiadamente desfavorável (KIRK, 1994).

As clorofilas são os principais pigmentos encarregados na absorção da luz essencial ao processo fotossintético. Destaque especial à clorofila *a* que absorve maior radiação eletromagnética nos comprimentos de onda aproximadamente de 380 a 450 e 580 a 700 nm, e em segundo plano à clorofila *b* que absorve mais na faixa de 400 a 500 e 625 a 675 nm (Figura 5) (NELSON & COX, 2014). Todavia, a extensão do espectro visível varia de 400 a 700 nm, e a absorção de radiação eletromagnética distinta das realizadas pelas clorofilas *a* e *b*, pode suceder-se por meio de outras estruturas compreendidas nos cloroplastos (OOMS *et al.*, 2016).

FIGURA 5 - Absorção de luz visível por fotopigmentos.



FONTES: NELSON & COX (2014).

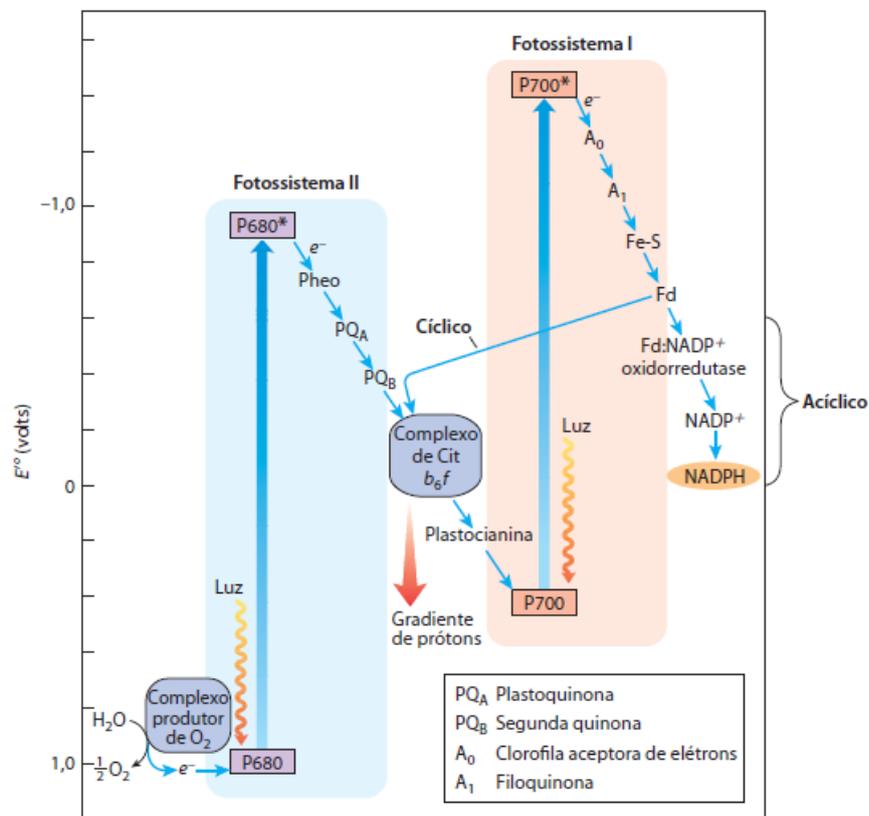
No Complexo do fotossistema II, uma molécula de água é quebrada em um complexo produtor de oxigênio (CPO), liberando O_2 e H^+ para o tilacoide, aumentando o gradiente de pH entre o tilacoide e o estroma, e elétrons para o complexo CPO. Os elétrons são transportados por 4 íons manganês até a tirosina, que os remete até o pigmento clorofila (P680). Depois de receber os elétrons, o pigmento é reduzido, permanecendo em uma forma estável. Para suceder a oxidação do pigmento é necessária energia na faixa de 680nm, a qual pode ser obtida pela luz solar, e com essa absorção o pigmento fica em estado excitado, liberando os elétrons que são capturados pela feofitina (NELSON & COX, 2014).

A feofitina reduz o receptor primário Q_A (uma molécula de plastoquinona ligada a uma proteína), que, por sua vez, passa seu elétron a outra plastoquinona mais frouxamente ligada, Q_B . Quando Q_B adquire dois elétrons de Q_A em duas dessas transferências e dois prótons de água, ele está em sua forma totalmente reduzida de quinol. Os elétrons de quinol passam pelo complexo de citocromos *b6f* (NELSON & COX, 2014).

A plastocianina transporta os elétrons ao centro de reação do PS I, P700, que similar ao P680, absorve energia luminosa até excita-se e liberar elétrons, que são transportados até serem capturados pela ferredoxina, resultando na redução do $NADP^+$. Essa redução ocorre no estroma, contribuindo para o gradiente de pH entre ele e o tilacoide. Como o lúmen tilacoide possui uma quantidade muito maior de prótons, esses fluem espontaneamente para o estroma. Esse fluxo libera a energia necessária para a fosforilação

do ADP em ATP que ocorre durante a fosforilação cíclica (Figura 6) (NELSON & COX, 2014).

FIGURA 6 - Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos.



FONTE: NELSON & COX (2014).

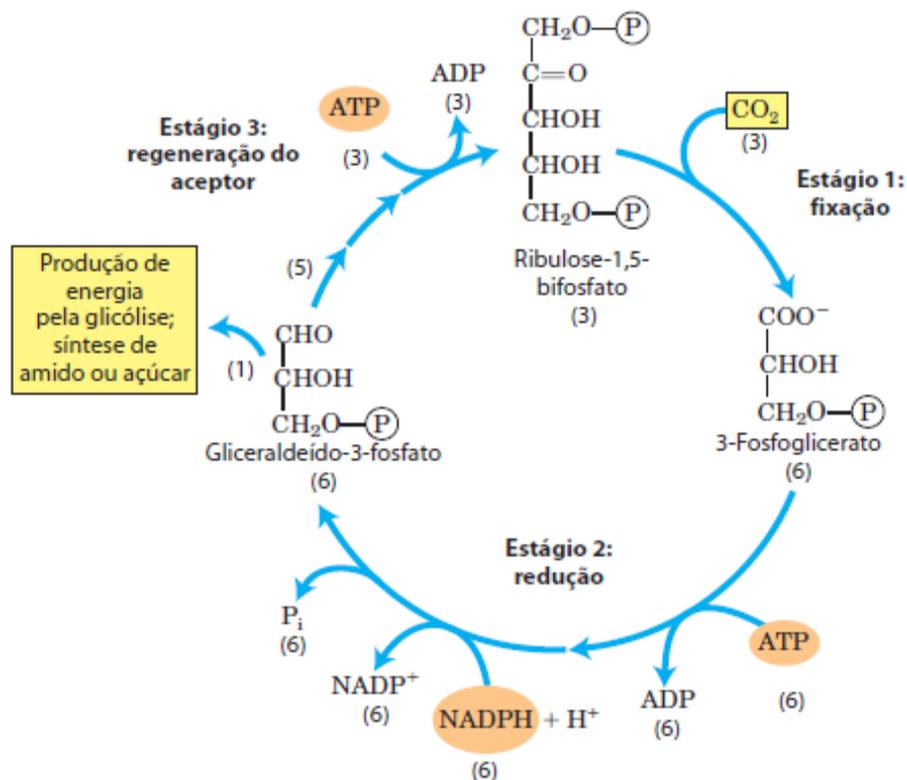
2.1.3.2 Reações de fixação de carbono

A síntese de glicose e amido, além da fixação de CO₂, acontecem a partir das reações do Ciclo de Calvin-Benson. Para tal, duas moléculas de NADPH₂ e três moléculas de ATP são necessárias para fixar uma molécula de CO₂ (NELSON & COX, 2014).

Conforme Richmond (2004), o ciclo de Calvin-Benson possui três estágios: carboxilação, redução e regeneração. A carboxilação da molécula de CO₂ com uma molécula de ribulose-1,5-bifosfato, catalisada pela enzima rubisco, gera duas moléculas de fosfoglicerato. Em seguida, reações enzimáticas induzem a redução do fosfoglicerato em carboidratos trioses fosfato. Ao término do ciclo, ocorre a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato, por uma série de reações que combinam os açúcares fosfatos. Assim, os

carboidratos são os produtos primários da fotossíntese, mas os ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos podem ser sintetizados durante a fixação do CO₂ (Figura 7).

FIGURA 7- Ciclo de Calvin-Benson.



FONTE: NELSON & COX (2014).

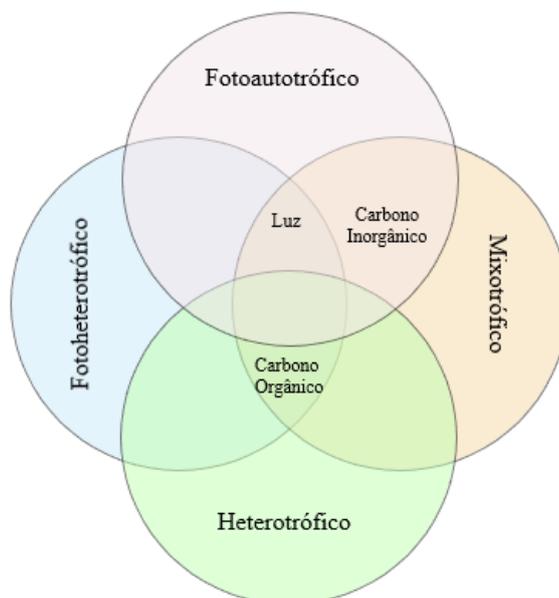
2.2 METABOLISMO CELULAR

As microalgas precisam de uma fonte de energia e materiais iniciais para manter a biossíntese, o crescimento e a divisão celular estáveis (SUN *et al.*, 2018). Os modos de cultivo afetam diretamente o crescimento resultante de microalgas e a composição bioquímica da biomassa (DANESHVAR, 2021). As microalgas podem apresentar as seguintes formas de metabolismo (Figura 8): fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. (BUMBAK *et al.*, 2011; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011; DANESHVAR, 2021).

- Fotoautotrófico: quando a energia é obtida de fonte luminosa e o carbono de fonte inorgânica, pela fotossíntese;
- Heterotrófico: quando a energia e o carbono são obtidos de fonte orgânica externa, em geral pela oxidação de açúcares;

- Mixotrófico: quando a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos ocorrem concomitantemente;
- Fotoheterotrófico: quando a fonte de energia é a luz, e a fonte de carbono são compostos orgânicos.

FIGURA 8 - Exigências de luz, carbono inorgânico e carbono orgânico para o cultivo fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico de microalgas.



FONTE: DANESHVAR (2021) modificado.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A alteração nos parâmetros do cultivo é capaz de modificar a taxa de crescimento algal, bem como sua composição celular (ILLMAN *et al.*, 2000). Deste modo, é possível otimizar por meio das condições de cultivo, a produção de compostos, como por exemplo os lipídios (CHAICHALERM *et al.*, 2012).

Os principais fatores que influenciam mais significativamente no crescimento das microalgas são: a intensidade luminosa, a temperatura, a agitação, o pH, a salinidade, a concentração de oxigênio dissolvido, a vazão de CO₂, a relação O₂:CO₂, bem como a composição nutricional do meio de cultivo (ANDERSEN, 2005; KUMAR *et al.*, 2010; MATA *et al.*, 2010; SCHNURR & ALLEN, 2015; ANTO *et al.*, 2019).

2.3.1 Luminosidade

A radiação eletromagnética é primordial para o crescimento das microalgas já que elas possuem atividade fotossintética. A porção de luz recebida pelos microrganismos irá refletir na quantidade de carbono fixado, além de influenciar na produção de biomassa, a taxa de crescimento e sua composição química (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

A clorofila tem um coeficiente de extinção elevado, em outras palavras é um bom absorvente de luz (KIRK, 1994). Um cultivo com baixa intensidade luminosa favorece a obtenção de biomassa rica em clorofila, enquanto alta intensidade favorece os parâmetros de crescimento (DANESI *et al.*, 2004). Porém, intensidade luminosa em demasia, danifica os fotossistemas presentes nas unidades fotossintéticas, propiciando um decréscimo na produtividade algal (Fotoinibição) (RUBIO *et al.*, 2003; SUH & LEE, 2003; FRANCO *et al.*, 2013). Quando ocorre a restrição luminosa, em células do cultivo com maior distanciamento da fonte luminosa, por causa do sombreamento das células, causado pela alta concentração celular, usamos o termo Fotolimitação (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

A literatura tem reportado estudos que exibem os efeitos causados pela taxa de luminosidade sobre a produtividade de biomassa e o teor lipídios, bem como os efeitos gerados na composição lipídica (RADAKOVITS *et al.*, 2010). Reboloso Fuentes e colaboradores (2000), em seu trabalho com a microalga *Phaeodactylum tricorutum* concluíram que, o aumento da luminosidade gera um aumento na produtividade e uma diminuição no teor de lipídios. Por outro lado, Gonçalves *et al.* (2013), notaram que utilizando energia luminosa com irradiância superiores a $72 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, houve um acúmulo substancial de lipídios para espécies *P. subcapitata* (29 mg g^{-1} de biomassa seca) e para a *C. vulgaris* (21 mg g^{-1} de biomassa seca), sendo essa quantidade superior ao encontrado para a irradiância de $36 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12 e 8 mg g^{-1} de biomassa seca respectivamente), em fotoperíodo de 24:00 h (luz:escuro).

Em seus estudos, Liu *et al.* (2012), ao utilizar a espécie *Scenedesmus* sp., sob a taxa de luminosidade de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obteve como resultados $3,88 \text{ g L}^{-1}$ de produtividade de biomassa com um teor lipídico de 41,1%.

2.3.2 Temperatura

A influência da temperatura na produtividade e na atividade celular, está relacionado a interdependência entre ela e os principais metabólitos presentes na célula, como por exemplo, as proteínas, os lipídios e os carboidratos, tal como aos parâmetros referentes a taxa de reação, que estão sujeitos a energia de ativação. Um aumento na temperatura consegue ocasionar um aumento na produção de biomassa, entretanto, se esse valor estiver fora da temperatura ideal, o crescimento pode ser inibido em razão da inativação das proteínas ocasionado por choque térmico (MAHBOOB *et al.*, 2012).

A temperatura de crescimento altera de acordo com cada espécie, sem nenhuma relação generalizada para todas as espécies (RAVEN & GEIDER, 1988; JAMES *et al.*, 1989). A conservação de culturas de microalgas deve manter a temperatura de acordo com a temperatura do local no qual a cepa foi coletada (GUALTIERI & BARSANTI, 2006; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014). Para microalgas encontradas em ambientes polares, o ideal é manter o cultivo com temperatura menor que 10°C. As encontradas em ambientes temperados, já suportam uma temperatura pouco maior, e podem ser acondicionadas a temperatura entre 10°C e 25°C. Já as coletadas em ambientes tropicais, normalmente utilizam temperaturas acima de 20°C (GUALTIERI & BARSANTI, 2006; LOURENÇO, 2006). A estabilidade da temperatura deve ser mantida a $\pm 2^\circ\text{C}$, sendo as cepas de água doce geralmente mais tolerantes à variabilidade de temperatura do que as cepas marinhas (ANDERSEN, 2005).

As microalgas por meio da sua temperatura ideal de cultivo, podem ser classificadas em psicrófilas, mesófilas e termófilas. Quando sua faixa de temperatura ótima é menor de 17°C, denomina-se psicrófilas, quando permanece entre 20 e 25°C, identifica-se como mesófilas, e quando apresentam temperaturas maiores de 40°C, nomea-se termófilas (RAS *et al.*, 2013; SAJJADI *et al.*, 2018).

A produção de lipídios pode ser influenciada pela temperatura. O aumento da temperatura no cultivo das microalgas gera um aumento no teor de proteínas e uma diminuição nos teores de carboidratos e lipídios (RENAUD *et al.*, 2002; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014; SU *et al.*, 2017; FAKHRY *et al.* 2015). Ademais, com um aumento de temperatura muitas espécies microalgal diminuem os percentuais de ácidos graxos insaturados e aumentam os percentuais dos ácidos graxos saturados da fração lipídica (MORTENSEN *et al.*, 1988). Em elevadas temperaturas ocorre a pausa nos processos de dessaturação das cadeias de ácidos graxos. A fluidez da camada fosfolipídica

da membrana celular está associado ao grau de insaturações, que se torna menos fluida com uma diminuição do número de insaturações na cadeia de ácidos graxos. (THOMPSON *et al.*, 1992; RENAUD *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1999)

Chinnasamy e colaboradores (2009) estudaram a microalga *Chlorella vulgaris*, e constataram que sua taxa de crescimento é maior quando a temperatura está 30°C. Kerby e Stewart (1988) ao estudar o mesmo gênero observou que a temperatura ideal para um rápido crescimento, deve estar entre 20 e 32°C.

Renaud e colaboradores (1995) pesquisaram sobre espécies de microalgas tropicais do litoral da Austrália e concluíram que houve aumento na produção de ácidos graxos saturados 14:0, 16:0 e 18:0 com o aumento da temperatura em todas as espécies estudadas.

Xin e colaboradores (2011), analisaram a espécie *Scenedesmus* sp., a maior taxa de crescimento e produção de biomassa, além da produção de lipídios, aconteceu com a temperatura de 20°C. Notou-se que quando o cultivo era feito nas temperaturas 25°C e 30°C, a quantidade de lipídios diminuiu em 31 e 50%, respectivamente.

2.3.3 pH

Segundo Andersen (2005), as microalgas encontradas em água doce, na generalidade, preferem ambientes com o pH entre 5 e 7, em contrapartida, as cianobactérias preferem ambientes com o pH entre 7 e 9.

O pH influencia na solubilidade do CO₂ e dos minerais no meio de cultivo, bem como a distribuição das formas inorgânicas de carbono, interferindo na atividade metabólica das células (BECKER, 1994; BECKER, 2004; ARREDONDO-VEJA & VOLTOLINA, 2007).

O carbono inorgânico apresenta-se de diferentes formas no meio de cultura, podendo-se encontrar na forma de dióxido de carbono (CO₂), ácido carbônico (H₂CO₃), íon bicarbonato (HCO₃⁻) ou íon carbonato (CO₃⁻) (ESTEVES, 1998). O aumento do pH podem ocorrer em função do metabolismo autotrófico, quando o HCO₃⁻ se desidrata, formando CO₂, consumido na fotossíntese e íons OH⁻ (SHIRAIWA *et al.*, 1993). Em compensação, a adição de CO₂ no meio reduz o pH (RAVEN, 1990; SCHMIDT, 2007).

De acordo com Wojciechowski e colaboradores (2013), a alteração de pH pode agir negativamente na permeabilidade da membrana, transporte iônico e velocidade das reações químicas.

Qiu e colaboradores (2017) em seus estudos com a microalga *Chlorella sorokiniana* obtiveram uma produção de biomassa maior com o pH 6, obtendo um valor de $0,140 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1}$ por dia. O menor valor encontrado foi para o pH 9, alcançando um valor de $0,071 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1}$ por dia.

2.3.4 Agitação (Aeração)

A aeração da cultura é um fator importante que afeta o crescimento de microalgas e a produção de biomassa (DANESHVAR *et al.*, 2021). A técnica de circulação de um cultivo microalgal possibilita que as células fiquem suspensas no meio, melhora a eficiência na utilização da luz, facilita a troca de gases, impede a estratificação térmica, auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes, impede o acúmulo de matéria orgânica na base do reator e a sedimentação das microalgas (BOYD *et al.*, 1984; ANDERSEN, 2005; GUO *et al.*, 2015).

A aeração auxilia no fornecimento adequado de CO_2 para o crescimento de microalgas. Além de transportar CO_2 para o meio de cultivo, a aeração fornece poder de mistura e forma um fluxo turbulento no reator. O fluxo turbulento e as bolhas aumentam a transferência de massa entre as fases gasosa e a líquida (ZHAO *et al.*, 2011).

Características como peso, tamanho, densidade das células de microalgas e tolerância à tensão de cisalhamento influenciam a taxa ideal de mistura e aeração. Uma taxa de aeração superior ao valor ideal pode danificar as células da microalga devido aos efeitos da força de cisalhamento, aumentando a evaporação e os custos de operação (GUO *et al.*, 2015).

Quando as bolhas de CO_2 deixam o aerador e se movem em direção às algas, as moléculas de CO_2 transbordam da superfície da bolha. Em seguida, uma parte das moléculas de CO_2 são absorvidas pelas células microalgais fixadas na superfície da bolha, e o restante é dissolvido no meio de cultivo (CHENG *et al.*, 2018).

O diâmetro de geração de bolhas deve ser reduzido para aumentar o tempo de residência das bolhas de CO_2 na solução de microalgas e para facilitar a absorção pelas células de microalgas (FREEMAN ROSENZWEIG *et al.*, 2017). A fim de que a solubilidade dos gases torne-se mais eficaz, é essencial proporcionar bolhas pequenas (LOURENÇO, 2006).

Comumente, o meio de cultivo é aerado utilizando um compressor ou bomba de ar ou por agitação do meio. Quando há a injeção de ar, unidades como L min^{-1} e vvm são

usadas para denotar a magnitude da aeração. Em vvm, o primeiro v representa o volume do ar em litros, o segundo v representa o volume do meio, também em litros, e m é o tempo em minutos (DANESHVAR *et al.*, 2021).

Han e colaboradores (2015b) verificaram o efeito de diferentes taxas de aeração (0,067–0,333 vvm) no crescimento microalgal. Para aeração de 0,2 vvm obtiveram o maior peso seco (1,24 g L⁻¹). As taxas de aeração mais baixas ocasionaram mistura insuficiente e as mais altas geraram danos às células.

Em estudos, Mohsenpour & Willoughby (2016), concluíram que a microalga *C. vulgaris* durante a fase de crescimento obteve um aumento na biomassa com 5% de aeração de CO₂ em comparação com o ar puro na condição de controle. Os perfis de crescimento com 15% de CO₂ na aeração foram semelhantes aos dados obtidos para 5%, embora o crescimento foi inibido após cinco dias de cultura.

2.3.5 Composição nutricional do meio de cultivo

Os meios de cultura são soluções que contêm nutrientes essenciais que as microalgas necessitam para manter um estado estacionário, saudável e com bom crescimento (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2014).

Um elemento é classificado como essencial quando, sua carência impede a microalga a concluir seu ciclo de vida. Essa carência não pode ser substituída por outros elementos para o desempenho de sua função, além de estar envolvido diretamente na nutrição da alga (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

Os nutrientes podem ser divididos de acordo com a quantia necessária para um bom crescimento. Temos os macronutrientes que inclui elementos como carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e fósforo, que as microalgas precisam em maior quantidade (g L⁻¹) nos meios de cultivo. Já os micronutrientes necessitam de concentrações mais baixas (mg L⁻¹ ou menos), como por exemplo o cobalto, zinco, manganês e bário (GROBBELAAR, 2013).

Meios formulados e águas residuais são muito utilizados como meios de cultura para proporcionar os nutrientes para o desenvolvimento de microalgas. Os meios formulados são misturas sintéticas com concentrações recomendadas de micronutrientes e macronutrientes (POLAT *et al.*, 2020).

Os meios formulados podem ser aplicáveis como meios não específicos, portanto, sendo úteis para o cultivo de muitas espécies de microalgas ou podem ser projetados para

um grupo específico de microalgas. Por exemplo, Bold's Basal Medium (BBM) é usado para cultivo de microalgas marinhas, em contrapartida, o Guillard (f/2) é utilizado no cultivo de microalgas de água doce, já o Blue-Green (BG-11) é um meio apropriado para o cultivo de cianobactérias, mas também é amplamente utilizado para o cultivo de microalgas (ENAMALA *et al.*, 2018).

O termo meio modificado é frequentemente utilizado quando a composição do meio é alterada pelo aumento ou diminuição das concentrações originais dos compostos no meio de cultura. Meios modificados são usados para aumentar a produção de biomassa de microalgas, para estimular a produção de metabólitos especiais ou para estudar os efeitos da deficiência ou privação de nutrientes (DANESHVAR, 2021).

2.4 SISTEMAS DE CULTIVO

A escolha de um reator ou recipiente adequado para o cultivo é um dos fatores importantes que precisam ser decididos em um estágio inicial. Corriqueiramente, o termo biorreator é aplicado aos recipientes que suportam o crescimento de microalgas para produção de biomassa e formação de produto. Nesse sentido, fotobiorreatores se referem a biorreatores que fornecem luz para microalgas (DANESHVAR, 2021).

Fotobiorreatores dispõem de maior produtividade de biomassa do que lagoas de canal aberto devido à sua falta de dependência do clima e baixa vulnerabilidade à contaminação por outros organismos (SINGH & SHARMA, 2012), além da capacidade aprimorada de controlar as variáveis de cultivo (CHISTI, 2007).

Biorreatores com vários tamanhos, formas e materiais são encontrados para cultivo de microalgas. Biorreatores artesanais são confeccionados principalmente de vidro transparente ou materiais poliméricos, como policarbonato. Frascos, garrafas ou Erlenmeyer com diferentes volumes têm sido largamente utilizados como biorreatores para o cultivo de microalgas. Embora esses biorreatores simples auxiliem com sucesso no crescimento de microalgas e na produção de biomassa e possam atender aos requisitos de muitos tópicos de pesquisa, eles nem sempre são apropriados. Por exemplo, em alguns experimentos, o nível de pH, as concentrações de CO₂ e O₂, a temperatura etc. devem permanecer constantes. Nesse caso, biorreatores avançados disponíveis comercialmente são necessários para controlar e monitorar parâmetros sensíveis e para atingir o desempenho ideal do sistema durante os experimentos (MUSTAFA *et al.*, 2018).

O fotobiorreator de placa plana é um recipiente de 5–6 mm de espessura para permitir a penetração de luz ideal e permitir que a cultura atinja alta densidade celular (TAN *et al.*, 2018). O sistema de fotobiorreator de placa plana tem maior eficiência fotossintética e menor acúmulo de oxigênio dissolvido do que fotobiorreatores tubulares (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Fotobiorreatores tubulares são verticais, horizontais, inclinados ou em hélice e são direcionados para a luz do sol para alcançar alta eficiência de conversão solar (ELRAYIES, 2018). Os sistemas de fotobiorreatores tubulares reduziram a eficiência fotossintética devido ao acúmulo de oxigênio, o acúmulo de microrganismos patogênicos nas paredes internas e o alto consumo de energia, em comparação com uma placa plana e fotobiorreatores de bolha (MORENO-GARCIA *et al.*, 2017). Os fotobiorreatores verticais apresentam menores densidades de fluxo de fótons incidentes na superfície do reator, como resultado, apresentam maior produção de área de biomassa devido à sua maior intercepção de luz, em comparação aos fotobiorreatores tubulares horizontais (DE VREE *et al.*, 2015).

Fotobiorreatores de coluna são geralmente cilíndricos e têm uma altura de até 4 m e raio de até 0,2 m (SHOW *et al.*, 2017). Este projeto melhora a troca gás-líquido, e a taxa de transferência de massa regula o tempo de residência das bolhas de gás (SOMAN & SHASTRI, 2015).

Microplacas ou placas multipoços também têm sido usadas para cultivo de microalgas. As microplacas podem ser consideradas biorreatores em miniatura que são apropriadas para os experimentos com alto número de tratamentos em pequenos volumes de microlitros a mililitros (DANESHVAR, 2021).

2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA ALGAL

A coleta de biomassa é o processo em que ocorre a remoção da água do meio de cultura de microalgas, incorporando várias técnicas, a fim de concentrar a biomassa. Uma técnica de colheita apropriada é selecionada considerando o consumo geral de energia e o custo que depende principalmente do tamanho e densidade da célula (VASISTHA *et al.*, 2020). Sistemas de lago aberto e fotobiorreatores de fluxo contínuo fechados (PBR) fornecem solução diluída de algas. A lagoa aberta que contém matéria seca variando de 0,05–0,75%, enquanto o PBR fechado contém matéria seca variando entre 0,3 e 0,4% (FASAEI *et al.*, 2018).

O custo e a energia necessários para a colheita são uma preocupação significativa (TAN *et al.*, 2018). Na escala industrial, a colheita constitui até 30% do custo total de produção (RAWAT *et al.*, 2011).

As propriedades fundamentais que influenciam a recuperação da biomassa de microalgas durante a colheita são o tamanho da partícula, morfologia, peso específico e carga (PAHL *et al.*, 2013). Contudo, outros fatores como composição do meio, salinidade e hidrofobicidade também influenciam a recuperação da biomassa de microalgas (BARRUT *et al.*, 2013).

2.5.1 Coleta da biomassa

2.5.1.1 Métodos químicos

A floculação é um processo de colheita de algas, no qual células de microalgas espalhadas são agrupadas para formar grandes unidades e assim, facilitar sua separação com a água (UDUMAN *et al.*, 2010). Quando comparada a várias técnicas de colheita, a floculação é o processo mais eficaz, conveniente e econômico (JAPAR *et al.*, 2017).

A floculação pode ocorrer por neutralização de carga, remendo, varredura e ponte de adsorção (MATHIMANI & MALLICK, 2018). A floculação química pode ser induzida por três tipos de flocculantes: flocculantes inorgânicos, polímeros inorgânicos e polímeros orgânicos (YIN *et al.*, 2020).

Os polímeros orgânicos mais utilizados são: quitosana, poliácridamidas, celulose, surfactantes, certas fibras sintéticas etc. Esses polímeros orgânicos catiônicos podem minimizar a eletronegatividade das algas e atuar como uma ponte entre as células. A quitosana é muito utilizada nesse processo. A biodegradabilidade é a principal qualidade da quitosana, logo, não ocorre a contaminação dos flocos. Em contrapartida, seu valor é elevado, o que a torna inadequada para utilização industrial (YIN *et al.*, 2020).

Dentre todos os flocculantes, os inorgânicos apresentam valor mais acessível para compra. O processo requer baixo pH para formar produtos de hidrólise catiônica. Flocculantes inorgânicos agregam células por meio da neutralização de carga; a maior densidade de carga do flocculante causa uma melhor taxa de floculação. A hidrólise do metal é responsável pela formação do óxido metálico, que precipita e forma uma carga positiva que resulta na neutralização da carga. O problema desse flocculante é a contaminação da biomassa (VASISTHA *et al.*, 2020).

2.5.1.2 Métodos físicos

A centrifugação com base mecânica utiliza a força centrífuga para a separação com base nas diferenças de densidade (CHRISTENSON & SIMS, 2011). Os vários tipos de sistemas de centrifugação disponíveis são: hidrociclone; decantador de tigela sólida; tipo de bico; disco de ejeção sólido. Com base na quantidade de biomassa colhida e na eficiência de remoção de microalgas, o tipo de bico é um instrumento promissor entre outros (YIN *et al.*, 2020). Porém, o custo operacional e o alto investimento quando utilizado a centrifuga devem ser levados em consideração (SHELEF *et al.*, 1984).

A Filtração é utilizada para separar sólidos de líquidos ou gases, inserindo um meio o qual, apenas o fluido consegue passar. O cultivo de microalgas passa por um filtro com uma membrana porosa, que detêm as microalgas, enquanto a água passa por meio de força motriz. Há vários tipos de processos de filtração, como microfiltração, macrofiltração, ultrafiltração, filtração a vácuo, filtração sem saída, filtração de pressão e filtração de fluxo tangencial (ENAMALA *et al.*, 2018). O método de filtração é eficaz, mas tem problemas de entupimento e incrustação que podem causar baixos rendimentos de colheita (BARROS *et al.*, 2015).

A sedimentação por gravidade é um método de separação sólido-líquido pelo qual a lama concentrada é precipitada sob a ação da gravidade (NIE *et al.*, 2018). A sedimentação por gravidade pode fornecer concentrações de 1,5% de sólidos, e sua eficiência depende do tempo e da velocidade de sedimentação, que está relacionada à densidade citoplasmática (MILLEDGE & HEAVEN, 2013). A sedimentação é uma técnica simples e econômica, mas não é adequada para uma grande variedade de microalgas e consome muito tempo (GUPTA *et al.*, 2017).

A flotação é o processo em que bolhas são formadas, que se ligam ao tamanho de partícula desejável e, portanto, faz com que as células subam para a superfície e se concentrem (PRAGYA *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2015; LAAMANEN *et al.*, 2016). De acordo com o tamanho da bolha, a flotação é classificada em quatro tipos: flotação por ar dissolvido; flotação por ar disperso; flutuação eletrolítica; flotação dispersa por ozonização. A flotação é um método promissor para a coleta de espécies de microalgas de água doce, com as vantagens de pequeno espaço necessário e tempo de operação relativamente curto (YIN *et al.*, 2020).

O método elétrico de colheita inclui eletrocoagulação e flutuação, o que requer alto consumo de energia para o abastecimento e consumo das microbolhas, juntamente com

alto custo do equipamento, o que muitas vezes o torna inadequado para a colheita (KIM *et al.*, 2015).

2.5.1.3 Métodos biológicos

O termo biofloculação se destina a mostrar a floculação causada pelos biopolímeros secretados, especialmente substâncias poliméricas extracelulares ou ácidos γ -glutâmicos, evitando a adição de flocculantes químicos (CHEN *et al.*, 2018). A biofloculação pode ser categorizada em quatro tipos: floculação bacteriana; floculação fúngica; floculação de actinomicetos; floculação à base de plantas (YIN *et al.*, 2020).

A autofloculação ocorre em culturas de microalgas quando o pH se eleva acima de 9 (SPILLING *et al.*, 2011). A carga negativa presente na superfície das microalgas se desestabiliza com o aumento do pH, o que faz com que as microalgas floculem e se acomodem. Este processo é econômico, não tóxico para as microalgas e não requer etapas adicionais a jusante (VASISTHA *et al.*, 2020).

2.5.1.4 Métodos magnéticos

A separação magnetoforética tem ganhado atenção cada vez maior para a colheita de microalgas, devido à facilidade de operação, economia de tempo e síntese simplificada de materiais, bem como sua reutilização (MARKEB *et al.*, 2019). A base desse processo de coleta é marcar as células da microalga com partículas magnéticas e separá-las facilmente da cultura usando um campo magnético externo (WANG *et al.*, 2016a). Na linha das principais limitações, a separação pós-colheita e a reciclagem de nanopartículas podem aumentar o custo geral do processo (YIN *et al.*, 2020).

2.5.2 Secagem

Para que não ocorra a degradação da biomassa da microalga torna-se indispensável o processo de secagem após o método de colheita (KLEIN *et al.*, 2018).

Os parâmetros de secagem afetam as propriedades químicas da biomassa (SAHOO *et al.*, 2017). Por exemplo, o maior teor de água na biomassa de microalgas reduz a eficiência do processamento do biodiesel, reduzindo o rendimento (TAN *et al.*, 2018).

A técnica de secagem é um problema no cultivo das microalgas, pois eleva em 75% os custos do processo. Os métodos de secagem empregados para a secagem de microalgas incluem secagem solar, secagem por pulverização, liofilização, secagem rotativa, secagem por incinerador, secagem de prateleira a vácuo e secagem de ar de fluxo cruzado (SHOW *et al.*, 2013). Todos esses métodos relativamente caros, tornando-os economicamente inadequados (SAHOO *et al.*, 2017).

2.6 LIPÍDIOS

Todas as células vegetais, incluindo as de microalgas, apresentam lipídios na sua composição (RICHMOND, 2004). Os lipídios são considerados moléculas biológicas apolares, insolúveis em água, mas que se dissolvem facilmente em solventes orgânicos apolares (NELSON & COX., 2014), e divide-se em duas categorias com base na polaridade da molécula (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014):

- Lipídios neutros, que compreendem acilgliceróis e ácidos graxos livres;
- Lipídios polares, que são classificados em fosfolipídios e glicolipídios.

Tem alguns tipos de lipídios neutros que não inclui ácidos graxos como os hidrocarbonetos, esteróis, cetonas, pigmentos (carotenos e clorofilas). Apesar dessas frações lipídicas sejam solúveis em solventes orgânicos, elas não são convertidas em biodiesel (HALIM *et al.*, 2012).

Os lipídios também podem ser classificados em simples e complexos (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014):

- Lipídios simples: óleos, gorduras e ceras, que são ésteres derivados de ácidos carboxílicos.
- Lipídios complexos: fosfolipídios, glicolipídios, carotenoides, tocoferóis, vitaminas A, D, K e esteroides, entre outros, todos insolúveis em água.

Os lipídios simples, denominados triglicerídeos ou triacilglicerídeos (TAG), contêm um álcool denominado glicerol e ácidos carboxílicos conhecidos como ácidos graxos, e são os mais comuns encontrados nas microalgas (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

Os ácidos graxos têm a denominação baseada em duas características importantes: o número total de átomos de carbono na cadeia e o número de ligações duplas na cadeia de hidrocarbonetos (PEREIRA *et al.*, 2012). Os ácidos graxos podem ser livres ou esterificados e geralmente têm um número par de carbonos dispostos em uma cadeia linear. Os ácidos graxos insaturados geralmente têm configuração *cis*, já que a maioria dos ácidos

graxos trans não são encontrados na natureza, mas em gorduras que passaram por processos artificiais, principalmente como um produto secundário da hidrogenação de gorduras insaturadas (BELLOU *et al.*, 2014). A composição dos ácidos graxos em microalgas varia de acordo com a espécie e parâmetros de cultivo, diferindo na composição dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (D'OCA *et al.*, 2011).

A eficiência de produção de lipídios de microalgas versus oleaginosas foi comparada em termos de uso da terra na Tabela 1. Embora o teor de óleo de microalgas seja dependente da cepa e semelhante ao teor de óleo de sementes terrestres, há uma diferença significativa na produtividade geral de biomassa e rendimento de óleo resultante (GHASEMI *et al.*, 2012).

TABELA 1 - Comparação do potencial do óleo de microalgas com outras matérias-primas.

Planta	Galão de óleo/Acre	Teor de óleo na semente (%)
Dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	610	35,3
Palmeira Macaúba (<i>Acrocomia aculeate</i>)	461	28,35
Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>)	383	45
Palmeira Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	335	19
Oiticica (<i>Licania rigida</i>)	307	80
Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	276	35,3
Abacate (<i>Persea Americana</i>)	270	8-32
Castanha do Pará (<i>Bertholletia excelsa</i>)	245	66,9
Noz de macadâmia (<i>macadâmia terniflora</i>)	230	71,6
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i>)	194	28
Palmeira babaçu (<i>Orbignya martiana</i>)	188	60
Jjoba (<i>Simmondsia chinensis</i>)	186	48-56
Pecan (<i>Carya illinoensis</i>)	183	71,2
Bacuri (<i>Platonia insignis</i>)	146	13,5
Castor Bean (<i>Ricinus communis</i>)	145	48
Oliveira (<i>Olea europaea</i>)	124	20
Colza (<i>Brassica napus</i>), canola	122	30
Papoula do ópio (<i>Papaver somniferum</i>)	119	45-50
Amendoim (<i>Ariachis hypogaea</i>)	109	53-71
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	98	47,3

Tungue (<i>Aleurites fordii</i>)	96	50-60
Arroz (<i>Oriza sativa L.</i>)	85	10
Buffalo Gourd (<i>Cucurbita foetidissima</i>)	81	33
Cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i>)	80	30-40
Crambe (<i>Crambe abyssinica</i>)	72	27,8-35,3
Gergelim (<i>Sesamum indicum</i>)	72	49,1
Camelina (<i>Camelina sativa</i>)	60	40
Mostarda (<i>Brassica alba</i>)	59	35-46
Coentro (<i>Coriandrum sativum</i>)	55	13-20
Semente de Abóbora (<i>Cucurbita pepo</i>)	55	46,7
Euphorbia (<i>Euphorbia lagascae</i>)	54	48-52
Avelã (<i>Corylus avellana</i>)	49	50-70
Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>)	49	34
Café (<i>Coffea arabica</i>)	47	10-20
Soja (<i>Glycine max</i>)	46	17,7
Cânhamo (<i>Cannabis sativa</i>)	37	35
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	33	40
Calêndula (<i>Calendula officinalis</i>)	31	17-24
Kenaf (<i>Hibiscus cannabinus L.</i>)	28	20
Semente de borracha (<i>Hevea brasiliensis</i>)	26	24 (semente) 40 (kernel)
Tremoço (<i>Lupinus albus</i>)	24	7,2-8,2
Palma (<i>Erythea salvadorensis</i>)	23	20-45
Aveia (<i>Avena sativa</i>)	22	3,1-11,6
Castanha de caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	18	41,7
Milho (<i>Zea mays</i>)	18	4
Microalgas (baixo teor de óleo)	6275	30
Microalgas (teor médio de óleo)	10.455	50
Microalgas (alto teor de óleo)	14.635	70

FONTE: SAJJADI *et al.* (2018) modificado.

Os lipídios de microalgas são tipicamente compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos, contendo entre 12 e 24 carbonos, incluindo ácidos graxos de cadeia média (C10-C14), de cadeia longa (C16-18) e de cadeia longa (C20-C24) (SHAHZAD *et al.*, 2010). Os ácidos graxos com apenas uma ligação insaturada são chamados de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), aqueles com mais de dois são

ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (CHRISTIE & HAN, 2010). Os ácidos graxos saturados (SFA) correspondem à maior fração de lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos insaturados podem representar entre 20% e 60% dos lipídios totais (BREUER *et al.*, 2013) (Tabela 2/TABELA 2).

TABELA 2- Conteúdo lipídico e perfil de ésteres metílicos de ácidos Graxos (FAME) de diferentes espécies de microalgas.

Espécie de Microalga	Lipídios Totais (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
<i>Achnanthes</i> sp.	44,5	40,2	45,9	14,3
<i>Amphora</i> sp.	24	41,28	38,16	8,42
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	16,49	41,39	28,41	30,20
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	20,66	37,33	22,43	40,24
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	17,5	23,43	23,27	37,16
<i>Botryococcus braunii</i>	44,97	9,85	79,61	10,54
<i>Botryococcus terribilis</i>	49,00	43,15	44,29	12,56
<i>Chlamydocapsa bacillus</i>	13,52	35,68	23,58	40,74
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	18,9	28,18	22,88	32,07
<i>Chlamydomonas</i> sp.	15,07	78,61	14,63	6,76
<i>Chlorella emersonii</i>	18,6	24,55	17,01	38,37
<i>Chlorella protothecoides</i>	18	22,79	19,23	36,19
<i>Chlorella salina</i>	11	29,34	18,52	40,63
<i>Chlorella vulgaris</i>	28,07	52,15	37,51	10,33
<i>Chlorella vulgaris</i>	17,3	25,06	24,80	45,90
<i>Coelastrum microporum</i>	20,55	45,87	38,03	16,10
<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	17,99	34,54	44,08	21,38
<i>Dunaliella salina (Shariati)</i>	18,9	13,93	29,52	42,65
<i>Dunaliella salina (UTEX)</i>	24	22,77	22,89	34,47
<i>Dunaliella</i> sp. (Persian Gulf)	22	13,47	24,74	48,15
<i>Heterosigma</i> sp.	39,9	45,4	31,0	23,7
<i>Kirchneriella lunares</i>	17,30	32,06	23,11	44,83
<i>Nannochloropsis</i> sp.	42,4	35,7	34,8	27,0
<i>Scenedesmus obliquus</i>	16,73	70,83	21,71	7,46
<i>Scenedesmus</i> sp.	16	18,59	26,86	30,00

FONTE: MENEGAZZO & FONSECA (2019) modificado.

Os ácidos graxos são nomeados sistematicamente a partir do hidrocarboneto saturado com o mesmo número de átomos de carbono, sendo o -e final alterado para -óico. Assim, o ácido graxo com 16 átomos de carbono é sistematicamente denominado ácido hexadecanóico, embora seja mais comum ver o nome trivial de ácido palmítico na literatura. Também pode ser denominado um ácido graxo "C16" ou com maior precisão como "16: 0", o número antes do cólon especificando o número de átomos de carbono, e depois do cólon, o número de ligações duplas. Uma lista dos ácidos graxos saturados comuns junto com seus nomes triviais e designações abreviadas é fornecida na Tabela 3.

TABELA 3 - Ácidos graxos saturados de fórmula geral $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$.

Nome sistemático	Designação abreviada	Nome trivial
Etanóico	2: 0	Acético
Butanóico	4: 0	Butírico
Hexanóico	6: 0	Capróico
Octanóico	8: 0	Caprílico
Nonanóico	9: 0	Pelargônico
Decanóico	10:0	Cáprico
Undecanóico	11:0	-
Dodecanóico	12:0	Láurico
Tridecanóico	13:0	-
Tetradecanóico	14:0	Mirístico
Pentadecanóico	15:0	-
Hexadecanóico	16:0	Palmítico
Heptadecanóico	17:0	Margaric
Octadecanóico	18:0	Esteárico
Nonadecanóico	19: 0	-
Eicosanóico	20: 0	Araquídico
Heneicosanóico	21: 0	-
Docosanóico	22: 0	Beênico
Tetracosanóico	24: 0	Lignocérico

FONTE: CHRISTIE (1989) modificado.

2.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS

De acordo com o pré-tratamento utilizado na concentração de células da biomassa de microalgas, esta pode ser submetida à extração de lipídeo na forma concentrada úmida ou em pó seco (MEDINA *et al.*, 1998). Vários métodos são utilizados para extração de materiais intracelulares presentes nas microalgas. Os principais procedimentos incluem o emprego de ultrassom, micro-ondas, autoclave, homogeneizadores, soxhlet e moinhos (método mecânico). Ademais, há os métodos não mecânicos, que englobam o uso de solventes orgânicos, choques osmóticos e enzimas (HALIM *et al.*, 2012).

O método de extração de lipídios deve ser rápido, eficiente e delicado para reduzir a degradação de lipídios e ser economicamente viável (GREENWELL *et al.*, 2010). O objetivo do processo de extração é obter óleo das células de algas para facilitar sua conversão em biocombustível ou outros produtos agrícolas por meios bioquímicos ou termoquímicos (SUALI & SARBATLY, 2012). Idealmente, uma tecnologia de extração de lipídios para a produção de biodiesel de microalgas precisa apresentar um alto nível de especificidade para lipídios, a fim de minimizar a coextração de contaminantes não lipídicos, como proteínas e carboidratos (HALIM *et al.*, 2012).

2.7.1 Campo elétrico pulsado

Este método é usado para a ruptura da célula, um dispositivo de extração de lipídios, constituído por um anodo e um catodo, gerando pulsos elétricos curtos com alta força de campo elétrico para criar microporos na membrana celular, fazendo a quebra da parede celular (SILVE *et al.*, 2018). Portanto, esse processo é conhecido como eletroporação ou eletromobilização. Os resultados indicaram que quanto maior o tempo de exposição aumenta o rendimento lipídico. No entanto, essas técnicas não convencionais de ruptura e extração de células mecanicamente assistidas não são muito viáveis em grande escala, devido aos altos custos e requisitos de energia (VASISTHA *et al.*, 2020).

2.7.2 Ultrassom

A ultrasonicação é um dos métodos mais eficientes para o rompimento de células e tem sido muito utilizado para a remoção de lipídio. Ondas sonoras com frequência acima de 20 kHz são aplicadas ao meio de cultura, fazendo com que ocorra a alternância entre

compressão (alta pressão) e rarefação (baixa pressão) na amostra (GREENLEY & TESTER, 2015). Microbolhas podem se formar na região de baixa pressão, levando à ruptura citoplasmática e à liberação de biomoléculas lipídicas (VASISTHA *et al.*, 2020).

A utilização de técnicas de pré-tratamento atua como coadjuvantes no processo de extração, potencializando-o. O ultrassom pode elevar em mais de 50% o teor de lipídios extraídos da biomassa (GAROMA & JANDA, 2016). A força ultrassônica e o tipo de solvente afetam a eficiência desta técnica. Além do óleo puro, outros compostos bioquímicos na biomassa microalgal, como carotenoides e clorofila, também podem ser extraídos usando a técnica de ultrassom com resultados comparáveis ao método supercrítico (MACIAS-SANCHEZA *et al.*, 2009). O principal benefício da ultrasonicação é a baixa temperatura para quebrar as paredes das células quando comparada com os equipamentos de geração de calor, como autoclave ou forno de micro-ondas (SUSLICK & FLANNIGAN, 2008).

2.7.3 *Micro-ondas*

A irradiação eletromagnética na faixa de frequência de 0,3–300 GHz é reconhecida como micro-ondas (SATI *et al.*, 2019). A radiação de micro-ondas pode ser usada para a liberação de compostos intracelulares. Nesse processo, um material polar é hospedado em um campo elétrico que oscila muito rapidamente e produz micro-ondas que geram calor a partir das forças de atrito que surgem dos movimentos intermoleculares e intramoleculares. Durante esse processo de aquecimento, o vapor é gerado dentro do vaso, o que resulta na ruptura da célula. Por sua vez, isso aumentará ou abrirá as membranas celulares dos organismos com o efeito de eletroporação. Essa técnica envolve a geração rápida de calor e alta pressão dentro do vaso, resultando em uma boa classe de extratos (ENAMALA *et al.*, 2018). Este processo é usado para biomassa de algas secas e úmidas de forma eficaz (BUNDHOO, 2018).

2.7.4 *Extração por fluido supercrítico*

A extração com fluido supercrítico é outro processo que tem recebido atenção crescente como uma alternativa importante aos métodos tradicionais de separação, sendo o CO₂ o solvente mais eficiente (MENDES *et al.*, 1995). A extração de dióxido de carbono é preferível porque os compostos podem ser obtidos sem contaminação por solventes

orgânicos tóxicos e sem degradação térmica. O óleo extraído por esta técnica é de alta qualidade (SUALI & SARBATLY, 2012).

O método de extração por fluido supercrítico consiste em aumentar a pressão e temperatura de um fluido acima de seus valores críticos para que esse fluido entre na região supercrítica (MUBARAK *et al.*, 2015). O fluido supercrítico tem propriedades físicas diferentes do estado líquido e gasoso, o que permite uma rápida penetração deste fluido por meio da matriz celular, resultando em um rendimento mais elevado de lipídios totais e um tempo menor de extração. Além do CO₂, diversos fluidos podem ser utilizados nas extrações por fluido supercrítico (SILVA *et al.*, 2016). Porém, essa técnica tem a desvantagem no valor de aquisição do módulo e o alto consumo de energia para a compressão do fluido e seu aquecimento (MUBARAK *et al.*, 2015).

2.7.5 Extração por solventes orgânicos

Os princípios da extração de lipídios de microalgas por solvente orgânico são vinculados ao conceito básico de química de 'semelhante, dissolve semelhante' (HALIM *et al.*, 2012). Existem dois tipos de associações que ocorrem nos lipídios (VAN NIEUWENHUYZEN, 2015):

- Lipídios polares: Ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas;
- Lipídios neutros e não polares: Forças de Van Der Waals.

Solventes orgânicos polares, por ex. álcoois (metanol ou etanol) rompem as ligações de hidrogênio entre lipídios polares enquanto solventes orgânicos não polares, ex: hexano, são comumente usados para quebrar as interações hidrofóbicas entre lipídios neutros e não polares. Portanto, a escolha do solvente está diretamente ligada à espécie da microalga e seus arranjos lipídicos. Custo, toxicidade, volatilidade, polaridade e seletividade devem ser levados em consideração na escolha do solvente (CHATSUNGNOEN & CHISTI, 2016a).

2.7.5.1 Método de Folch

Esta é a técnica de extração mais popular, na qual solventes são usados para homogeneizar as células. A combinação mais comum usada é clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 para um volume final vinte vezes o volume da célula de algas para a extração de lipídios. Após a adição da amostra à mistura solvente, toda a mistura é exposta a agitação suave, seguida de centrifugação ou filtração para recuperar a fase líquida. O

manuseio rápido e fácil de grande quantidade de amostras é a principal vantagem desse método (ENAMALA *et al.*, 2018).

2.7.5.2 Método de Bligh e Dyer

Essa técnica é bastante semelhante ao método Folch, mas varia bastante na proporção de solventes (BLIGH & DYE, 1959). Neste método, as proteínas da amostra são precipitadas entre as duas fases lipídicas, tanto a extração quanto a partição lipídica são realizadas simultaneamente. A combinação do solvente também pode mudar com base na polaridade dos lipídios presentes nas espécies de algas. Além da principal técnica de Bligh e Dyer, muitos pesquisadores em todo o mundo também modificaram dependendo da situação e da condição dos laboratórios. Hajra (1974) propôs uma modificação do método de Bligh e Dyer, eles substituíram a água com cloreto de sódio a concentração de 1 molar, para que ele possa evitar a ligação de acidilipídeos a lipídios desnaturados (JENSEN, 2008). Essa adição de cloreto de sódio, também proporciona um menor tempo para que as fases se separem, além de melhorar o rendimento da extração. Do mesmo modo, a adição de 0,5% de ácido etanoico à fase aquosa melhorou a recuperação de fosfolípidos ácidos (ENAMALA *et al.*, 2018).

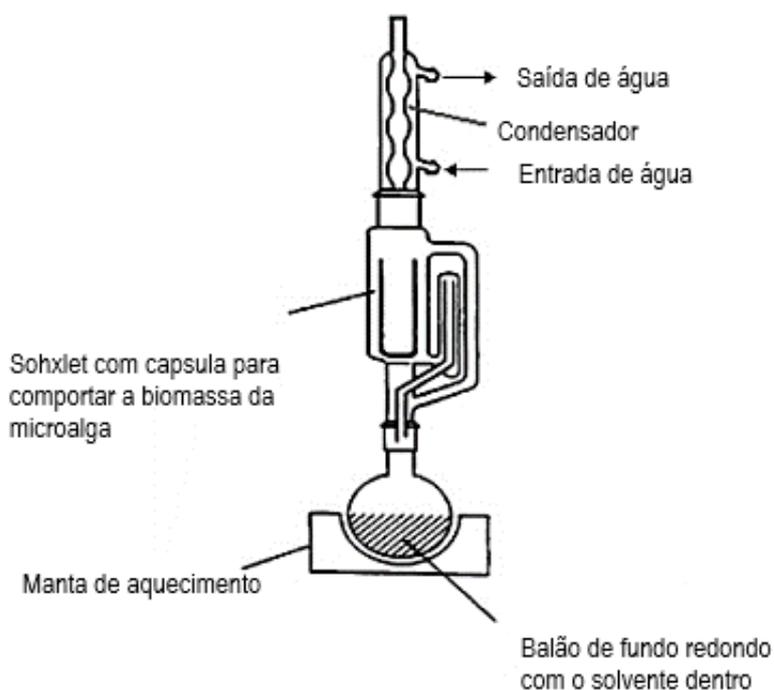
2.7.5.3 Método de Soxhlet

Franz von Soxhlet, em 1879 inventou um aparelho para a extração de lipídios. Atualmente uma alternativa muito usada na extração, juntamente com os solventes orgânicos. O aparelho é constituído por um balão de fundo redondo, que permanece aquecido (manta de aquecimento ou banho maria) em todo o processo de extração, e irá armazenar o solvente e o lipídio durante o processo; o extrator Soxhlet (Figura 9) onde é colocada a biomassa microalgal e um condensador em contínuo resfriamento (PRAGYA *et al.*, 2013).

A extração ocorre em fluxo contínuo de evaporação e condensação do solvente. O solvente localizado no balão de fundo redondo, aquecido pela manta térmica, evapora, e quando entra em contato com o condensador é rapidamente condensado e armazenado no extrator onde contém a biomassa algal. Por meio do contato do solvente com a biomassa, ocorre a extração dos lipídios. Um cartucho localizado dentro do extrator evita que a biomassa seja carregada junto com o fluxo de solvente, funcionando como um filtro.

Quando o solvente presente no extrator atinge o nível de transbordamento, um sifão descarrega a mistura solvente contendo os lipídios do extrator de volta ao balão de fundo redondo. O solvente é novamente aquecido e evaporado, enquanto os lipídios brutos extraídos permanecem no balão de fundo redondo. Este ciclo é repetido até que não haja mais lipídios brutos para serem extraídos no extrator de Soxhlet. Apesar do seu desenho vantajoso, o aparelho Soxhlet requer elevado consumo de energia para uma destilação contínua (POHNDORF *et al.*, 2016).

FIGURA 9 - Extrator Soxhlet.



FONTE: HALIM *et al.* (2012) modificado.

2.8 PRODUTOS E APLICAÇÕES DAS MICROALGAS

2.8.1 Aplicações farmacêutica, cosméticos e alimentar

Várias cepas de microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poli-insaturados e pigmentos carotenoides, que possuem propriedades terapêuticas (TRIPATHI *et al.*, 1999). Podem ser vendidos como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas em forma de pó, tabletes, cápsulas ou extratos. Além disso são adicionados em massas, petiscos, doces,

bebidas, tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais (PULZ & GROSS, 2004).

2.8.1.1 Ácidos graxos poli-insaturados

As mudanças na dieta humana, nos últimos séculos, e o acentuado aparecimento de uma série de doenças relacionadas ao baixo consumo de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente os pertencentes da família Ômega-3, gera uma busca maior por fontes capazes de produzi-los (SIMOPOULOS, 2002).

Os ácidos graxos podem ser obtidos de fontes animais ou vegetais, tanto terrestres quanto aquáticas, e diversos microrganismos têm sido considerados como uma alternativa às fontes usuais desta classe de lipídios (CERTIK & SHIMIZU, 1999). Os lipídios de algumas espécies contêm quantidades relativamente altas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (MEDINA *et al.*, 1998). Os PUFAs (ácidos graxos poli-insaturados) têm função na prevenção e tratamento de uma série de doenças cardiovasculares, da aterosclerose e da arritmia, da redução da pressão arterial, da redução dos níveis de colesterol e triglicérides no plasma, da artrite reumatoide, do câncer e são aparentemente essenciais na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral (GILL & VALIVETY, 1997; SIMOPOULOS, 2002).

2.8.1.2 Clorofila

Moléculas de clorofila são os principais biopigmentos de microalgas usados como aditivos alimentares. A clorofila também é muito utilizada na indústria alimentícia para obtenção de corantes verdes. Exemplo de produtos alimentares que utilizam clorofila de microalgas: cookies amanteigados e biscoitos utilizam a *Chlorella vulgaris*, massas de *Arthrospira platensis*, biscoitos de *Tetraselmis suecica* e *Phaeodactylum tricornerutum* e gomas de mascar de *Isochrysis*. A clorofila é aprovada pela Food and Agricultural Organization (FAO), como aditivo alimentar, por ser segura para consumo humano e resistente a mudanças de pH, temperatura etc. (SRIVASTAVA *et al.* 2022)

2.8.1.3 Carotenoides

Os carotenoides funcionam como fotoprotetores e como pigmentos fotossintéticos secundários. Diversas espécies podem acumular grande concentração de betacaroteno, astaxantina ou cantaxantina, os quais têm uma ampla aplicação como corantes naturais e como antioxidantes (BAKER & GUNTER, 2004).

O crescente interesse industrial por esses pigmentos naturais pode ser explicado pela capacidade atribuída a eles de prevenir doenças degenerativas: combatendo os radicais livres e funcionando como agentes anticâncer e estimuladores do sistema imunológico (OROSA *et al.*, 2000). Comparados aos corantes sintéticos, são mais resistentes à presença de ácido ascórbico, ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades (SKULBERG, 2004).

2.8.1.4 Betacaroteno

Este composto, extraído da biomassa microalgal, vem sendo aplicado comercialmente como corante natural, podendo atuar como provitamina A, antioxidante e contra doenças degenerativas. O preço deste produto varia entre US\$ 300,00 e US\$ 3.000,00 por quilograma, de acordo com a qualidade do produto e a demanda (BECKER, 2004).

2.8.1.5 Astaxantina

O maior mercado para a astaxantina tem sido a aquicultura, onde é especialmente empregada para dar a cor avermelhada à carne do salmão cultivado (TRIPATHI *et al.*, 1999). A astaxantina natural é vendida por aproximadamente US\$ 2.500,00 o quilograma (CYSEWSKI & LORENZ, 2004), sendo que 95% do consumo mundial da aquicultura são abastecidos com astaxantina sintética (MARGALITH, 1999).

2.8.1.6 Fucoxantina

A fucoxantina é um pigmento importante e um dos principais carotenoides nos cloroplastos de Phaeophyta (macroalgas) e diatomáceas marinhas (microalgas) (BÜCHEL, 2020). Muitos estudos demonstraram que o consumo de fucoxantina pode suportar funções

biológicas importantes, além de ter efeitos medicinais sobre as condições de saúde. Foi demonstrado que a fucoxantina pode ajudar na cura de muitas condições médicas crônicas, como doenças cardíacas, diabetes tipo 2, colesterol alto, hipertensão, obesidade entre outros (BAE *et al.*, 2020). Recentemente, a fucoxantina foi empregada em produtos de controle de peso corporal, como fūcoTHIN® da Garden of Life e Solaray Fucoxanthin Fórmula da Solaray® (ABU-GHOSH *et al.*, 2021).

2.8.1.7 Pigmentos de proteção solar e proteção UV

Os aminoácidos multifuncionais do tipo micosporina (MAAs) são metabólitos secundários extraídos de microalgas e cianobactérias que habitam ecossistemas marinhos com alta exposição à luz solar, particularmente alta em radiação ultravioleta (UVR), para protegê-los da energia luminosa prejudicial (ROSIC, 2019). Os MAAs mostraram alta eficiência na absorção de radiação UVR na faixa de 310 e 360 nm (SUN *et al.*, 2020), competindo, portanto, com filtros comerciais (ABU-GHOSH *et al.*, 2021). Os MAAs têm recebido atenção especial devido às suas aplicações em materiais não biológicos como tecidos, plásticos, vernizes e tintas para protegê-los contra a UVR que diminui sua qualidade e durabilidade (KAGEYAMA & WADITEE-SIRISATTHA, 2018).

2.8.2 Aplicações na agropecuária

2.8.2.1 Biofertilizantes

Microalgas são utilizadas na agricultura como biofertilizantes naturais para melhorar as características do solo, uma vez que possui fitohormônios e grandes quantidades de micro e macronutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas (GUO *et al.*, 2020). As concentrações de extrato de microalga também podem ser usadas como bioestimulantes de plantas para a germinação de sementes (STIRK & VAN STADEN, 2020).

Biofertilizantes são alternativas sustentáveis e orgânicas aos fertilizantes sintéticos, com boa relação custo-benefício (ABINANDAN *et al.*, 2019) Além disso, há uma crescente evidência de que as microalgas podem melhorar a saúde do solo, reduzir a ocorrência de erosão, podem ser usadas no tratamento de águas residuais para irrigação e remoção de metais do solo e recuperação de nitrogênio (CASTRO *et al.*, 2020).

2.8.2.2 Nutrição animal

Uma das principais aplicações dos ácidos graxos, extraídos das microalgas, que têm sido amplamente exploradas comercialmente é o enriquecimento de rações para peixes (MORAIS & COSTA, 2008). A piscicultura de água doce é, geralmente, considerada o maior empreendimento do setor na aquicultura mundial. Várias das principais espécies são consumidoras de plâncton. Este plâncton consiste principalmente de microalgas (fitoplâncton), bactérias, protozoários e zooplâncton (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

Um problema encontrado com o uso da biomassa de microalgas na alimentação animal é a baixa digestibilidade, devido ao alto conteúdo de celulose da parede celular. Ruminantes, tais como gado, são capazes de digerir o material celulolítico sendo, portanto, possível utilizar microalgas diretamente na ração animal (BECKER, 2004a).

A ração para uso na avicultura pode conter até 5-10% de biomassa de microalgas e isso pode ter efeito positivo na coloração da pele e da gema dos ovos, devido à presença de carotenoides (BECKER, 2004a).

2.8.3 Aplicações como fonte de energia renovável

2.8.3.1 Bio-óleo

O bio-óleo é obtido por tratamento térmico de biomassa seca na ausência de oxigênio a uma temperatura de cerca de 500°C e posteriormente submetido a resfriamento. São semelhantes aos óleos derivados do petróleo em termos de geração de energia e, portanto, podem ser empregados como seus substitutos. A produção de bio-óleo pode ser classificada em duas etapas: pirólise e liquefação termoquímica (BHATTACHARYA & GOSWAM, 2020). A pirólise é geralmente realizada em alta temperatura (350–530°C) para converter biomassa seca em líquida, sólida e gasosa. A parte líquida consiste em bio-óleo ou alcatrão e biomassa. Além disso, contém diferentes compostos naturais, incluindo lipídios, proteínas e carboidratos. No entanto, a quantidade de produção de biomassa é proporcional ao teor de lipídios presente nas algas. Muitas microalgas têm sido exploradas para a produção de bio-óleo pelo processo de pirólise ou método de liquefação térmica (PAN *et al.*, 2018).

2.8.3.2 Biometano

A produção de biogás a partir da biomassa ganha importância devido à necessidade dos consumidores e com a conscientização dos usuários para o uso de fontes de energia ecologicamente corretas. A produção de biogás pode ser realizada em um digestor anaeróbico contendo população microbiana sinérgica que converte compostos de biomassa de algas em metano e CO₂. Então, o metano pode ser utilizado de forma eficiente como combustível, bem como matéria-prima química (BHATTACHARYA & GOSWAM, 2020).

2.8.3.3 Bioetanol

A utilização da biomassa de algas para a produção de bioetanol vem ganhando atenção devido a diversos fatores, incluindo alta eficiência da biomassa, melhor variedade de algas, presença de extensa composição de amido e carboidratos, estruturas delgadas de parede celular e altas taxas fotossintéticas dos organismos. Normalmente, a produção de bioetanol a partir de algas envolve dois métodos - fermentação e gaseificação (BHATTACHARYA & GOSWAM, 2020).

2.8.3.4 Biobutanol

Em muitos países da Ásia, Europa e América do Sul, o desenvolvimento da cultura de algas está sendo realizado para a geração de bioetanol e biogás, embora nos EUA sejam utilizadas para a produção de biobutanol. Nos últimos 100 anos, o butanol tem sido utilizado como combustível no transporte e tem sido sugerido como uma fonte potencial de biocombustível, para substituir o etanol como substância aditiva de petróleo devido à sua baixa pressão de vapor e alta densidade de energia (CHO *et al.*, 2017). Os micróbios usados para a produção de butanol usam amido, açúcares e celulose presentes na biomassa de algas como substância; conseqüentemente, a produção de butanol poderia ser tão lucrativa monetariamente quanto o etanol (GAO *et al.*, 2016).

2.8.4 Aplicações Ambientais

2.8.4.1 Fixação de CO₂

A biofixação de CO₂ por microalgas tem provado ser um método eficiente e econômico, principalmente devido à capacidade fotossintética desses micro-organismos ao uso deste gás como fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento. Morais e Costa (2007) testaram em fotobiorreatores tubulares a capacidade de biofixação de CO₂ por microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina sp.* em concentrações de situação limitada e em excesso de CO₂. A *Spirulina* apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros avaliados, dentre eles a taxa de crescimento específica, produtividade e biofixação de CO₂.

2.8.4.2. Tratamento de efluentes

A composição dos efluentes pode variar de acordo com sua origem. Muitos efluentes podem conter grande quantidade de matéria orgânica, ou ainda apresentar altas concentrações de metais tóxicos, representando um grave problema para o meio ambiente (SCHMITZ *et al.*, 2012).

Shrikant & Madaan (2021) estudaram a aplicação da *Chlorella sp.* no tratamento de efluentes gerados na fábrica de agrotóxicos. Os resultados obtidos para a relação luz:escuro de 16:8 h mostraram remoção de DQO de 49,09%; remoção de DBO de 55,56%; Remoção de fosfato de 96,06%; Amônia de 32,47% e remoção de sódio de 37,43% sob luz solar natural. Da mesma forma, observou-se que com fonte de luz artificial em laboratório, as eficiências melhoraram e atingiram 87,42%, 84,44%, 99,97%, 80,99%, 48,38% e 32,30% para DQO, DBO, Fosfato, Amônia, Sódio e Potássio, respectivamente.

2.9 BIOCOMBUSTÍVEIS

A crise energética está intensificando globalmente em virtude do desenvolvimento industrial e ao crescimento exponencial da população. Fontes como gasolina, diesel, gás natural, carvão, que foram consideradas as fontes básicas para manter a vida, estão se esgotando devido ao uso extensivo. Além do mais, esses combustíveis fósseis liberam gases tóxicos e nocivos para a atmosfera e poluem o meio ambiente. Os níveis de gases de efeito estufa (GEE) no ambiente aumentaram a uma taxa alarmante na era pós-

industrialização em 25% do total. Os principais contribuintes incluem dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e outros fluoro-hidrocarbonetos. Atualmente, substituir os combustíveis fósseis por outras fontes alternativas, especialmente aquelas que beneficiam o meio ambiente, é a melhor solução (ENAMALA *et al.*, 2018).

Carvão biológico, biodiesel, bioetanol e biohidrogênio são algumas fontes de energia renováveis promissoras. Cerca de 95% da produção comercial atual de biodiesel é produzida a partir de óleos vegetais comestíveis ao custo da destruição de recursos vitais do solo, desmatamento, consumo de grande quantidade de água doce e grande parte das terras aráveis. O aumento do preço do óleo vegetal e a crise dos alimentos versus combustíveis são problemas associados à geração de biocombustíveis a partir de plantas, árvores e oleaginosas. Conseqüentemente, a demanda por outras fontes possíveis de biocombustível aumentou significativamente (SAJJADI *et al.*, 2018).

Os biocombustíveis são divididos em três gerações, dependendo da fonte de onde são obtidos (LIEW *et al.*, 2014):

- Biocombustíveis de primeira geração são produzidos principalmente a partir de sementes oleaginosas comestíveis, safras de alimentos e gorduras animais;
- Biocombustíveis de segunda geração usam resíduos de biomassa de baixo valor, como sementes oleaginosas não comestíveis, resíduos de óleo de cozinha e matérias-primas lignocelulósicas (por exemplo, resíduos florestais, bagaço de cana-de-açúcar, palha de cereais);
- Biocombustíveis de terceira geração derivados de microalgas.

A produção de biocombustíveis usando as microalgas oferece as seguintes vantagens (LI *et al.*, 2008):

- A alta taxa de crescimento de microalgas torna possível para satisfazer a demanda massiva de biocombustíveis usando recursos de terra limitados sem causar déficit potencial de biomassa;
- O cultivo de microalgas consome menos água do que as culturas terrestres;
- A tolerância das microalgas ao alto conteúdo de CO₂ em fluxos de gás permite uma diminuição de CO₂ de alta eficiência;
- A liberação de óxido nitroso pode ser minimizada quando microalgas são usadas para a produção de biocombustíveis;
- A agricultura de microalgas pode ser potencialmente mais econômica do que a agricultura convencional.

2.9.1 Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável obtido a partir de um processo químico denominado transesterificação. Por meio desse processo, os triglicerídeos presentes nos óleos e gordura animal reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, gerando dois produtos: o éster e a glicerina. O primeiro somente pode ser comercializado como biodiesel, após passar por processos de purificação para adequação à especificação da qualidade, sendo destinado principalmente à aplicação em motores de ignição por compressão (ciclo Diesel) (ANP, 2021).

A sua mistura ao diesel fóssil teve início em 2004, em caráter experimental e, entre 2005 e 2007, no teor de 2%, a comercialização passou a ser voluntária. A obrigatoriedade veio no artigo 2º da Lei nº 11.097/2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo CNPE (Conselho Nacional de Política Energética) até o atual percentual de 13,0% (Figura 10) (ANP, 2021).

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel não é restritivo, permitindo a utilização de diversas matérias-primas. Independente da matéria-prima e da rota tecnológica, o biodiesel é introduzido no mercado nacional de combustíveis com especificação única. Ainda que cada matéria prima tenha suas próprias características, o biodiesel comercializado em todo o território nacional deve atender à especificação definida no Regulamento Técnico da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (resolução ANP Nº 45, de 25 de agosto de 2014). A Tabela 4 apresenta as especificações brasileiras para a comercialização do biodiesel (ANP, 2020).

O biodiesel tem propriedades únicas, que quase não incluem enxofre ou partículas que contribuem para a poluição do ar. Enxofre e outros materiais particulado têm sido responsáveis pela maioria dos problemas de fumaça preta e odor comumente atribuídos aos combustíveis diesel. O biodiesel também tem maior lubricidade do que o diesel de petróleo, que é a capacidade de reduzir o atrito das peças móveis. Além disso, o biodiesel de algas é um combustível neutro em carbono, o que significa que assimila quase o mesmo CO₂ durante o crescimento de algas e quando é liberado na combustão. Com base nas análises do ciclo de vida, o uso do biodiesel pode melhorar a qualidade do ar; reduzir as concentrações atmosféricas de CO₂ e diminuir a manutenção do motor (GALLAGHER, 2011).

FIGURA 10 - Linha do Tempo dos percentuais de adição de biodiesel para formulação do diesel B.



FONTE: ANP (2021).

TABELA 4 - Especificações do Biodiesel.

Característica	Limite
Aspecto	LII
Massa específica a 20° C	850 a 900 kg/m ³
Viscosidade Cinemática a 40°C	3,0 a 6,0 mm ² /s
Teor de água, máx.	200,0 mg/kg
Contaminação Total, máx.	24 mg/kg
Ponto de fulgor, mín.	100,0 °C
Teor de éster, mín.	96,5% massa
Cinzas sulfatadas, máx.	0,020% massa
Enxofre total, máx.	10 mg/kg
Sódio + Potássio, máx.	5 mg/kg
Cálcio + Magnésio, máx.	5 mg/kg
Fósforo, máx.	10 mg/kg
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx.	1
Número Cetano	Anotar
Índice de acidez, máx.	0,50 mg KOH/g
Glicerol livre, máx.	0,02% massa

Glicerol total, máx.	0,25% massa
Monoacilglicerol, máx.	0,70% massa
Diacilglicerol, máx.	0,20% massa
Triacilglicerol, máx.	0,20% massa
Metanol e/ou Etanol, máx.	0,20% massa
Índice de Iodo	g/100g
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	12 h

Fonte: ANP (2020) modificado.

2.9.2 Transesterificação

O óleo de microalgas consiste em compostos de hidrocarbonetos (triacilglicerídeos) que não são adequados para a maioria dos motores a diesel. O óleo de microalgas pode ser modificado para uso em motores a diesel por um processo químico conhecido como transesterificação (GALLAGHER, 2011). Sendo a principal vantagem desse processo é a simplicidade da técnica (SUAREZ *et al.*, 2007). O processo de obtenção de biodiesel por transesterificação envolve a reação de triacilglicerídeos com álcoois de cadeias curtas em presença de um catalisador, produzindo ácidos graxos (MENEGHETTI *et al.*, 2013) e glicerina. A glicerina é um coproduto que é removido e vendido para reduzir custos (GALLAGHER, 2011).

A reação de transesterificação ocorre em três reações consecutivas e reversíveis. O triacilglicerídeo é convertido em diacilglicerídeo, em seguida o diacilglicerídeo é convertido em monoacilglicerídeo, e este por último é convertido em glicerol, liberando em cada etapa um mol de éster (Figura 11). A estequiometria da reação requer três mols de álcool para cada mol de triacilglicerídeo, entretanto, para deslocar o sentido da reação no sentido da formação de produtos é utilizado um excesso do álcool (SRIVASTAVA & PRASAD, 2000).

O metanol é o álcool mais utilizado para produção do biodiesel no Brasil e no mundo, sendo seu custo no mercado internacional menor que o do etanol. O etanol gera um nucleófilo com maior obstrução estérica, dificultando sensivelmente a reação. Embora a temperatura de ebulição do etanol (aproximadamente 78°C) seja apenas ligeiramente

superior à do metanol, a recuperação do excesso é dificultada pela formação de azeotrópos, fenômeno não observado quando do uso do metanol como agente de transesterificação (RAMOS *et al.*, 2017).

FIGURA 11 - Etapas no processo de transesterificação de triacilglicerídeos

1. Triacilglicerídeo + R – OH \leftrightarrow Diacilglicerídeo + R' – CO – OR
2. Diacilglicerídeo + R – OH \leftrightarrow Monoacilglicerídeo + R'' – CO – OR
3. Monoacilglicerídeo + R – OH \leftrightarrow Glicerol + R''' – CO – OR

FONTE: SRIVASTAVA & PRASAD (2000).

2.9.3 Transesterificação *in situ*

Para converter lipídios em biodiesel, os lipídios geralmente são extraídos primeiro da biomassa seca, seguido pela transesterificação. No entanto, este processo convencional exige grande quantidade de energia. Um método inovador que pode simplificar o processo de reação e diminuir o gasto de energia é realizar a transesterificação diretamente na biomassa sem extração prévia de lipídios; tal processo é frequentemente referido como transesterificação *in situ* ou direta (CHEN *et al.*, 2020). Da maneira que o método *in situ* compreende a extração e conversão em uma única etapa, dispensa a necessidade de primeiro isolar o lipídeo antes de convertê-lo em biodiesel, o que pode levar a uma redução no custo (DONG *et al.*, 2013)

2.9.4 Principais fatores que influenciam a reação de transesterificação *in situ*

Os principais fatores que influenciam a eficiência da reação de transesterificação *in situ* são o tipo de catalisador, temperatura, tempo de reação, velocidade de agitação, umidade da biomassa, razão molar álcool/óleo e parede celular da microalga (SALAM *et al.*, 2016).

Os catalisadores empregados podem ser do tipo ácido, básico ou enzimático (VASIĆ *et al.*, 2020), baseado nisso, catalisadores básicos e ácidos podem ser subdivididos em catalisadores homogêneos e heterogêneos (MA *et al.*, 2021). O óleo de microalga comumente apresenta elevados valores de acidez, ao utilizar catalisadores básicos

homogêneos ocorre o processo de formação de sabão, promovendo um menor rendimento de biodiesel (GULDHE *et al.*, 2014), além de possuir uma seletividade referente ao tipo de lipídeo, ocasionando o processo de saponificação em altas concentrações de ácidos graxos livres. Contudo, em condições ótimas, as reações catalíticas com base homogênea são mais rápidas quando comparadas com as de catalisadores ácidos homogêneos (KARPAGAM, *et al.*, 2021). Em contrapartida, catalisadores ácidos homogêneos são indiferentes a ácidos graxos livres e capazes de catalisar sua esterificação, mas como desvantagem são corrosivos para instalações metálicas. Outra desvantagem, que ambos possuem, é não poderem ser reutilizados como os catalisadores heterogêneos (MA *et al.*, 2021).

As principais vantagens do catalisador ácido heterogêneo são sua compatibilidade com alta quantidade de ácidos graxos livres, uma separação mais fácil assim resultando em uma alta qualidade do produto e a eliminação do processo de lavagem do biodiesel. Os heteroácidos são facilmente regenerados e reciclados. Suas maiores limitações são o requerimento de maior temperatura e tempo. Dentre os catalisadores ácidos heterogêneo estão os óxidos metálicos e óxidos mistos, heteropoliácidos, resinas poliméricas ácidas, zeólitas, derivados de carbono ou lignina. A reação de transesterificação catalisada por base heterogênea é mais rápida do que a transesterificação catalisada por ácido heterogêneo. Exemplos de catalisadores básicos heterogêneos são os vários óxidos de metais alcalinos, óxidos alcalino-terrosos, óxidos de metais de transição, e óxido misto que mostram a natureza básica, carbono ou lignina suportados com grupos funcionais básicos ativos, líquido iônico básico e composto orgânico básico (NAYAK *et al.*, 2019).

Catalisadores enzimáticos são retirados de plantas, animais e fontes microbianas, como fungos e bactérias. A lipase é a enzima mais utilizada para produzir biodiesel de alta qualidade, em razão a sua alta tolerância à água, bom desempenho operacional em condições amenas, além de uma fácil recuperação. Distintos métodos de imobilização são utilizados para simplificar o processo de retirada e reutilização das enzimas na transesterificação, dentre eles estão a adsorção de suporte macroporoso e encapsulamento de aerogel de sílica. A transesterificação enzimática assistida por micro-ondas é limpa e de baixo custo, todavia, o tempo necessário para a transesterificação utilizando catalisador enzimático é alto e a possível desativação térmica da enzima são limitações do processo (NAYAK *et al.*, 2019).

A reação de transesterificação em meio básico homogêneo, utilizando um álcool de cadeia curta, pode ser realizada em temperaturas maiores a 40°C. Todavia, a aplicação de temperaturas mais elevadas é capaz de beneficiar não apenas a reação de transesterificação,

como também favorece a realização de reações paralelas indesejáveis (RAMOS *et al.*, 2017).

A utilização de álcool metanol na transesterificação *em situ* desempenha o papel de reagente e extrator. Entretanto, no papel de extrator de óleo, ele não possui uma alta eficiência, contribuindo para que ocorra uma baixa conversão de biomassa para biodiesel. Para resolver essa questão, é possível adicionar outro solvente de melhor desempenho extrativo, como por exemplo o clorofórmio ou o hexano, na reação *in situ*. Outro fator que influencia na reação para produção de biodiesel é a quantidade de álcool presente no meio reacional. Uma quantidade excessiva é fundamental para deslocar a reação no sentido dos produtos, e saber a proporção ideal de álcool e biomassa, faz com que ocorra uma alta conversão em biodiesel e uma economia de custo (LI *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 3 – ESTADO DA ARTE

3.1 CULTIVO MICROALGAS

Almutairi e colaboradores (2021) em seu trabalho, concluíram que o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), obtidos por meio do cultivo com indução de estresse, devido à alta quantidade de salinidade, é alterado, o tornando mais viável para a produção de biodiesel. Eles utilizaram para a pesquisa águas residuais de tratamento de osmose reversa (ORW), que possuía salinidade de $67,59 \text{ g L}^{-1}$, e a testaram tratada quimicamente para redução da salinidade (TRW), chegando um valor de $39,1 \text{ g L}^{-1}$ de salinidade. O crescimento da *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 resultou em $1,23 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca, enquanto o cultivo em ORW e TRW foi de $1,49$ e $2,19 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente. O teor de óleo celular foi de apenas 12% para o meio BG-11, 14,3% para ORW e 15,42% para TRW.

Liu e colaboradores (2021) compararam o crescimento da microalga *M. reisseri* FM1 em cultura em lote (8 g L^{-1}), cultura em lote alimentado (alimentado com 2 g L^{-1} quatro vezes) com glicose, maltose e acetato de sódio, respectivamente. Revelaram que o modo lote alimentado pode promover significativamente a taxa de crescimento específica e a produção de biomassa em comparação com cultura em lote. No ensaio de lote alimentado, o conteúdo de biomassa seca obtido a partir das três fontes de carbono (glicose, maltose e acetato de sódio) aumentou 31,4%, 49,2% e 67,0% em comparação com a cultura em lote, correspondentemente, a taxa de crescimento específica (dia^{-1}) em 5,7%, 8,3% e 10,9%, respectivamente.

Jayakumar e colaboradores (2021) investigaram as microalgas *Pleurosigma* sp., *Amphora* sp. e *Amphiprora* sp. Os resultados revelaram que *Amphiprora* sp. cultivadas em meio f/2 modificado por meio da adição de 30g de SiO_2 com nano mesoporos ($\text{SiO}_2\text{-NP}$), apresentaram maior rendimento de biomassa e maior taxa de crescimento em todas as análises, além de ter maior rendimento de óleo $52,94 \pm 0,42\%$.

Whangchai e colaboradores (2021) pesquisaram o cultivo fototrófico e mixotrófico de *C. vulgaris* para melhorar o rendimento de biomassa, teor de lipídios, teor de lipídios neutros e composição de ácidos graxos. O cultivo fototrófico de *C. vulgaris* produziu $1,28 \text{ g L}^{-1}$ de peso celular seco e teor de lipídios de 15,3% no dia 18, enquanto no modo

mixotrófico de cultivo, o acetato a 0,4% rendeu peso celular seco maior de 2,7 g L⁻¹ e 20,8% de lipídios em comparação com dextrose e bicarbonato.

Morales-Sánchez e colaboradores (2020) analisaram qual os melhores fatores para o cultivo da microalga *Chlamydomonas malina* RCC2488, que cresce em ambientes polares e possui grandes quantidades de biomassa e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Obtiveram que as maiores produtividades de biomassa (527 mg L⁻¹ dia⁻¹), lipídios (161,3 mg L⁻¹ dia⁻¹) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA; 85,4 mg L⁻¹ dia⁻¹) foram obtidas em uma salinidade de 17,5, intensidade de luz de 250 μmol fótons m⁻² s⁻¹ e condições repletas de nitrogênio.

Xu e colaboradores (2020) tiveram como objetivo investigar o acúmulo de lipídeos e a distribuição de EPA (ácido eicosapentaenóico C20:5) *E. vischeri* JHsu-01 em condições de limitação e replicação de nitrogênio. Os resultados mostraram que a limitação de nitrogênio pode restringir substancialmente o crescimento da microalga e inibir a síntese de EPA, mas aumenta o acúmulo de lipídios neutros. *E. vischeri* JHsu-01 distribuiu mais EPA nos lipídios da membrana sob condições repletas de nitrogênio, enquanto aqueles sob condições limitadas por nitrogênio tenderam a alocar EPA em lipídios de armazenamento.

Han e colaboradores (2020) estudaram a *Nannochloropsis* sp. e modificaram com o gene AtDXS. Em comparação com o tipo selvagem, a *Nannochloropsis* AtDXSoe3 obteve um aumento na produção de lipídios ~ 68,6% na depleção de nitrogênio (~ 1,08 g L⁻¹) e ~ 110,6% em alta luz (~ 1,15 g L⁻¹). Quanto ao lipídio neutro (triacilglicerol, TAG), as cepas modificadas produziram ~ 93,2% mais na depleção de nitrogênio (~ 0,77 g L⁻¹) e ~ 148,6% mais na luz alta (~ 0,80 g L⁻¹) do que o tipo selvagem. Esses valores excedem os registros disponíveis em microalgas industriais projetadas.

Aburai e colaboradores (2020) estudaram os efeitos da fonte de luz na produção de biomassa e lipídios da microalga aérea *Coccomyxa* sp. Quando o biofilme *Coccomyxa* sp. foi cultivado em algodão úmido com meio BBM em uma placa de Petri sob o LED vermelho, ele foi capaz de crescer e acumular lipídios sob a condição de fase aérea.

Gonçalves e colaboradores (2019a) em seu trabalho analisaram os efeitos dos fatores intensidade luminosa, fotoperíodo, pH, NaCl e concentração de nitrogênio na produção de carotenoides, utilizando a microalgas *Tetradismus acuminatus*. A otimização dos valores de intensidade de luz e fotoperíodo resultou na produção máxima de carotenoides em mg g⁻¹ (85 μmol m⁻² s⁻¹; 15,8:8,2 h luz:escuro) e em mg L⁻¹ (595 μmol m⁻² s⁻¹ por 24h). A validação experimental dos resultados mostrou sínteses de 7,6 mg g⁻¹ de astaxantina e 9,1 mg g⁻¹ de β-caroteno.

Gonçalves e colaboradores (2019b) investigaram os efeitos das condições espectrais de energia e intensidade luminosa que induziram a estimulação fotoquímica de *Tetrademus sp.* para a síntese de carotenoides e clorofilas a e b. A maior concentração de biomassa ($4,06 \pm 1,31 \text{ g L}^{-1}$) ao final do cultivo foi observada com a combinação da luz visível com a luz verde na intensidade luminosa de $95 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A combinação de luz vermelha: verde, na intensidade de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, promoveu as maiores concentrações de carotenoides totais ($6,09 \pm 0,29 \text{ mg gbiomassa}^{-1}$), clorofila a ($10,08 \pm 0,75 \text{ mg gbiomassa}^{-1}$) e clorofila b ($2,04 \pm 0,66 \text{ mg gbiomassa}^{-1}$).

Schuelter *et al.* (2019) em seu trabalho avaliou a atividade antimicrobiana de extratos obtidos do cultivo da biomassa de microalgas isoladas, mediante o diâmetro do halo de inibição (mm). Na pesquisa utilizou-se as suspensões bacterianas das espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. O extrato da microalga *Poterioochromonas malhamensis* produziu halos de inibição contra as cepas bacterianas selecionadas, sendo mais eficaz contra *E. coli* ($15,97 \pm 2,04 \text{ mm}$), seguido por *S. typhimurium* ($10,86 \pm 1,71 \text{ mm}$) e *S. aureus* ($5,41 \pm 0,91 \text{ mm}$), consequentemente classificada como um potencial produtor de compostos biologicamente ativos com atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar e outros.

Hinterholz *et al.* (2019) estudou o aprimoramento de um fotobiorreator de placas planas por intermédio da aplicação da fluidodinâmica computacional, para a obtenção de um cultivo de alta densidade, utilizando a microalga *P.malhamensis* em meio M-8 modificado. Os resultados da simulação mostraram que a adição de defletores perfurados aumentou consideravelmente a produção de biomassa em função das mudanças no movimento do fluido e turbulência.

3.2 LIPÍDIOS DE MICROALGAS

Vieira e colaboradores (2021) estudaram a microalga *Scenedesmus obliquus* e a influência da quantidade de biomassa e os tipos de agitação no processo de extração. A eficiência da extração de múltiplos estágios de lipídios brutos foi drasticamente diminuída por altas razões biomassa-solvente, e o uso de sistemas de mistura adequados e tempos de mistura mais longos aumentaram a eficiência dessa operação unitária. O maior teor de lipídios foi obtido usando agitador orbital ($210,1 \pm 10,9 \text{ mg g}^{-1}$), tempo de retenção de 55 min e relação biomassa-sólida de 6,6% (g g^{-1}).

Bhuyar e colaboradores (2021) em seus resultados obtidos mostram que a adição de ureia exibiu uma condição adequada para as células de microalgas *Coelastrum* sp. para a produção de lipídio. Portanto, concluiu-se que nutrientes suficientes aumentam o teor de lipídios mais alto nas células microalgais. Além disso, o cultivo em meios depletados de nitrogênio causa não apenas agregação de lipídios em células, mas também uma mudança incremental na composição de lipídios de lipídios ricos em ácidos graxos livres para lipídios contendo principalmente triglicerídeos.

Teco-Bravo e colaboradores (2021) pesquisaram os perfis lipídicos de dois modificados tolerantes a ácido (M1 e M5) e uma cepa de tipo selvagem de *Chlorella saccharophila*. Em comparação com as linhagens modificadas M1 e M5, a cepa selvagem apresentou a maior abundância relativa de hidrocarbonetos (73,63%), enquanto a abundância relativa de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) obtidos foi maior no M1 (28,39%) e M5 (29,17 %) modificados do que na cepa selvagem. Lipídios de alto valor, incluindo terpenos e álcoois graxos, também foram detectados em proporções maiores nos modificados M1 e M5 do que na cepa selvagem, enquanto esteróis foram detectados apenas nos modificados M1 e M5.

Amorim e colaboradores (2020) analisaram um problema atual da extração de lipídios da biomassa úmida, que consiste em formação de emulsões durante a mistura da biomassa microalgal e solventes orgânicos. A extração de lipídios úmidos de biomassa desproteïnizada resultou em uma emulsão menos estável que liberou duas vezes o solvente do que a biomassa de controle. No entanto, a separação mais rápida de fases que ocorreu durante a extração de lipídios úmidos da biomassa desproteïnizada resultou em um rendimento de lipídios duas vezes menor do que a biomassa de controle.

Ding e colaboradores (2020) propuseram estratégia de coextração de lipídios usando a microalga *Chlorella pyrenoidosa* e o cladóceros planctônico *Daphnia*. A coextração ocorre quando *Daphnia* ingere e digere a microalga *C. pyrenoidosa* em um processo de pré-tratamento, depois disso, os lipídios desses organismos são extraídos. As taxas ótimas de extração de lipídios e recuperação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram de até 41,08% e 12,35%, respectivamente, que foram maiores do que o método tradicional de extração de lipídios, que utilizava apenas a microalga na hora da extração, devido ao rico teor de óleo de *Daphnia*.

Sánchez-Bayo e colaboradores (2020) em seus estudos com extração de lipídeos a partir de microalgas utilizando diversos solventes (hexano, clorofórmio e metanol, metilciclohexano, acetato de etila) concluíram que a extração está condicionada a

polaridade do solvente, quanto maior constante dielétrica do solvente, maior será o rendimento na extração.

Daneshvar e colaboradores (2020) avaliaram a composição de ácidos graxos nos lipídios da microalga *Scenedesmus quadricauda* cultivada em meio BBM e DWW após um dia da colheita (biomassa fresca) e dois meses depois (biomassa armazenada). Concluíram que houve uma diferença significativa no perfil lipídico da biomassa de microalgas fresca e armazenada. Em todos os casos os ácidos graxos saturados, aumentaram significativamente na biomassa de microalgas armazenada, enquanto a porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poliinsaturados, foram observados mais elevados na biomassa microalgal fresca.

Park e colaboradores (2020) estudaram a extração do óleo da microalga *N. oceanica*, tanto na sua forma seca quanto na sua forma úmida, utilizaram como solvente o hexano, a mistura hexano - metanol (7:3), e clorofórmio - metanol (7:3). Obtiveram como resultado uma maior eficiência empregando como solvente a mistura clorofórmio - metanol em células secas (114,3%) e o menor resultado para hexano em células úmidas (12,7%). Para o hexano – metanol a diferença entre as células secas e a células úmidas foi de apenas 5,6%.

Zhou e colaboradores (2019) investigaram o processo de extração de lipídios auxiliado por micro-ondas utilizando à microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada em águas residuais. Os parâmetros de extração ideais foram determinados como: temperatura operacional de 130°C, tempo de extração de 0,25 h, proporção de solvente de n-hexano/isopropanol de 3:2 (V:V), proporção de fase de cossolvente/biomassa de 50:1 (mL:g). Taxas de extração relativa de ésteres metílicos de lipídios e ácidos graxos (FAMES) alcançadas usando extração assistida por micro-ondas foram 88,25% e 95,58%, respectivamente, o que é superior ao processo tradicional de extração por aquecimento em banho-maria.

3.3 BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS

3.3.1 Indireta

Jayakumar e colaboradores (2021) estudaram as microalgas *Pleurosigma* sp., *Amphora* sp. e *Amphiprora* sp para a produção de biodiesel. A microalga *Amphiprora* sp. obteve o melhor rendimento (em meio F2 modificado pela adição de Mesoporous Nano SiO₂. sob 24 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidade de luz) de $81,47 \pm 1,59\%$ ao usar 2% da

quantidade de catalisador, com razão de volume de 1,5:1 de metanol: óleo em 3 horas de reação a 65°C.

Mandik e colaboradores (2020) avaliaram a extração de lipídios da microalga *Chlorella* sp. utilizando como solvente o n-hexano e a mistura clorofórmio e metanol (método Bligh e Dyer) e em seguida realizou a transesterificação que consistiu em adicionar Clorofórmio e metanol na razão volumétrica de 1,35: 1 e ácido sulfúrico 5% p:v como catalisador ácido, foram adicionados aos lipídios extraídos a uma razão solvente:lipídio de 4: 1 (v:p) e a mistura foi sonicada em 50°C por 40 min. Como resultado obteve 26,3% e 32,8% de ácidos graxos livres para o hexano e para o clorofórmio:metanol, respectivamente.

Park e colaboradores (2020) estudaram a transesterificação e a esterificação do óleo obtido da microalga *N. oceânica*. Eles utilizaram dois óleos, um apenas extraído da microalga com alta carga de clorofila, e outro tratado com KOH para a remoção da clorofila. Os catalisadores empregados foram KOH, H₂SO₄, ZSM-5, Na/ZSM-5 e SO₄²⁻/ZSM-5. Para o óleo tratado com KOH, o teor de ácidos graxos obtidos, foram acima de 90% para todos os catalisadores, menos para a ZSM-5, que obteve um pouco mais de 20%. Já para o óleo não tratado, os melhores rendimentos foram com KOH e H₂SO₄, que ficaram acima de 75%.

Teo *et al.* (2016) utilizaram o óleo proveniente da microalga *Nannochloropsis oculata*, por meio da extração de lipídios utilizando a técnica de Bligh & Dyer, para reação de transesterificação, utilizando nano catalisador de metóxido de cálcio. O rendimento de FAME (éster metílico de ácido graxo) aumentou significativamente de 6,9% para 85,4% com razão molar de metanol de 10:1 para 60:1 (razão álcool:óleo). A concentração de catalisador durante a reação variou de 0 a 15 % em peso por 3 horas a 60°C. O rendimento máximo de FAME de 92,0% foi obtido a 12 % em peso de dosagem de catalisador.

Vijayaraghavan e Hemanathan (2009) trabalharam com o óleo extraído da microalga *Chlorella vulgaris* para realização do processo de transesterificação, utilizando etanol na presença de hidróxido de potássio como catalisador. Utilizaram a proporção 250:75 em volume de triglicerídeos:etanol com 1,25% de catalisador. Alcançaram uma conversão completa dos triglicerídeos em ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) no tempo de 360 min. Ao estudar o efeito do tempo de secagem da biomassa microalgal, obtiveram o teor de lipídios de 38, 46, 48 e 34% para os tempos respectivos de 30, 90, 120 e 240 min.

Li *et al.* (2007) analisaram os fatores temperatura, tempo, teor de água e razão molar para obter o maior rendimento em biodiesel, por meio da reação de transesterificação,

utilizando o óleo da microalga *Chlorella protothecoides* catalisada pela lipase imobilizada da *Candidia* sp. A melhor combinação do processo de transesterificação enzimática de lipídios foi de 75% de lipase imobilizada (g g^{-1}), teor de água de 10% (mL mL^{-1}) com base na quantidade de lipídios, razão molar 3:1 de metanol para óleo alimentado em batelada três vezes, na temperatura de 38°C e valor de pH de 7,0. Com essas condições, uma conversão de 98,15% foi alcançada em cerca de 12 h.

3.3.2 Direta (*in situ*)

Ehimen *et al.* (2011) em seu trabalho estudaram a influência da quantidade de álcool e da temperatura na reação de transesterificação *in situ*. Para realização dos experimentos utilizaram a microalga *Chlorella* cultivada em meio BG-11 a 25°C, posteriormente seca em estufa a 80°C até peso constante. Para reação, utilizaram 2,2 ml de ácido sulfúrico (98% de pureza) como catalisador para 15 g de microalga. Os resultados obtidos indicaram uma melhoria da conversão do óleo de microalga para ésteres metílicos de ácidos graxo com o aumento da temperatura e aumento do volume de álcool, com as menores conversões de equilíbrio observadas para um volume de metanol de 20 ml, para todos os níveis de temperatura estudados (23, 30, 60 e 90 C). No entanto, com o uso de volumes de álcool acima de 60 ml, não foram observadas diferença significativas na conversão utilizando a temperatura de reação de 60 e 90°C obtendo uma conversão próxima de 92,5% de FAME (éster metílico de ácido graxo).

Laurens *et al.* (2012) estudaram a transesterificação *in situ* da microalga *Nannochloropsis* sp utilizando diferentes catalisadores, obtendo como resposta o teor de FAME (éster metílico de ácido graxo). Os catalisadores básicos, Metóxido de sódio (NaOMe) e Tetrametilguanidina (TMG), alcançaram rendimentos de FAME inferior aos obtidos pela catalise ácida (0% para NaOMe e ~7,7% para TMG). Para transesterificação utilizando ácido clorídrico em metanol obtiveram o rendimento aproximado de 10,7%.

Ghosh *et al.* (2017) avaliaram melhor método de transesterificação, direta (1 etapa) ou indireta (2 etapas), e melhor catalisador ácido, dentre HCl e H₂SO₄, para produção de biodiesel utilizaram a microalga *Chlorella* sp. O melhor resultado encontrado foi para o HCl em uma única etapa, alcançando um rendimento de 58% (peso de biodiesel/peso do óleo), e o pior resultado para H₂SO₄ em uma única etapa, com rendimento de 44% (peso de biodiesel/peso do óleo).

Johnson e Zhiyou (2009) compararam a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos das reações de transesterificação direta e indireta (extração+transesterificação), utilizando a microalga *Schizochytrium limacinum*. Como resultado, obteve um maior rendimento de biodiesel de ~67% em base de biomassa seca, para transesterificação direta a 90°C, em 40 minutos, utilizando metanol como solvente, hexano como cossolvente e ácido sulfúrico como catalisador, na proporção em volume de 3,4:0,6:4. Para transesterificação indireta utilizou-se as mesmas condições de temperatura, tempo, quantidade de solvente, cossolvente e catalisador, obtendo um rendimento de 57% em base de biomassa seca, porém, utilizou clorofórmio em substituição ao hexano como cossolvente na reação.

Li *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do volume dos cossolventes, clorofórmio e n-hexano, no rendimento de biodiesel e no teor de FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos) por meio da transesterificação *in situ* de *Chlorella pyrenoidosa*. A reação foi realizada a 90°C com 1 g de pó de microalgas, 4 mL de metanol, ácido sulfúrico 0,5 molar, e volume do cossolvente foi fixado em 2, 4, 6 e 8 mL. O teor de FAME de todas as amostras manteve-se acima de 98%, sugerindo que o biodiesel é de alta qualidade. Para o volume de cossolvente de 2 mL a 6 mL, a produção de biodiesel aumentou com o aumento da quantidade de cossolvente, tanto para o clorofórmio quanto para o n-hexano. O maior rendimento de biodiesel foi obtido nas condições de 6,0 mL de n-hexano e 8,0 mL de clorofórmio onde a eficiência de conversão de biomassa para biodiesel foi de 94,3% e 95,7%, respectivamente.

3.3.3 Supercrítica

Jafari e colaboradores (2021) avaliaram um método de etapa única que converte diretamente microalgas úmidas em biodiesel diretamente com o envolvimento de dióxido de carbono supercrítico. O dióxido de carbono é explorado em um estado supercrítico para extrair simultaneamente lipídios da biomassa de algas impregnada com 15 mL de etanol por 1 g de microalga seca e transesterificar esse extrato para gerar ésteres etílicos de ácidos graxos. Biomassa microalgal úmida de *Nannochloropsis oculata* foi usado como biomassa para alimentação e H₂SO₄ foi utilizado como catalisador neste processo. A eficiência da produção de biodiesel é afetada pela temperatura e pelo teor de água. A água tem um efeito negativo na produtividade em temperaturas menores que 150°C. Por outro lado, em temperaturas de ~ 150°C, a produtividade do biodiesel não foi influenciada negativamente,

apesar do alto teor de água. Esses resultados sugerem que, ao aumentar a temperatura do processo, o biodiesel pode ser produzido de forma eficaz a partir de microalgas úmidas, reduzindo assim seus custos de produção.

Rathnam e colaboradores (2020) avaliaram a formação de ésteres etílicos de ácidos graxos, utilizando microalgas secas em supercrítico com etanol e acetato de etila. Como resultado, obtiveram uma conversão superior a 60% para o solvente etanol em todas as proporções entre algas e agente de etilação (peso:vol). Já para o acetato de etila em nenhuma proporção alcançaram 40% de conversão. Já no quesito pressão, para os dois solventes, houve um aumento na conversão em razão do aumento da pressão, estabilizando entre 23 e 25 Mpa.

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO

Para realização das atividades a microalga *P. malhamensis* foi coletada no dia 10/02/2016 na cidade de Toledo - PR, em uma fonte de água (24°43'53.8"S 53°44'21.9"W), e possui cadastro no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SisGen) n° A962896.

4.1.1 Meios de cultivo

Empregou-se meio de cultivo BG-11 líquido sob agitação para reativação do inóculo, enquanto para o cultivo em biorreator de 10 L de placas planas foi utilizado o meio M-8 modificado.

Para o preparo do meio BG-11 foram preparadas 9 soluções de estoque. Adicionou-se em um balão volumétrico com capacidade de 1 L, 10 mL de cada solução estoque de 1 a 8 (Tabela 5), e 1 mL da solução estoque 9 (Tabela 6), completando o volume com água deionizada. A solução final foi esterilizada em autoclave a 1 atm. por 20 minutos, e armazenada em refrigerador (STANIER *et al.*, 1971).

TABELA 5 - Composição do meio de cultivo BG-11.

	Soluções	Concentração (g L ⁻¹)
1	NaNO ₃	150,0
2	K ₂ HPO ₄	4,0
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6
5	Ácido cítrico.H ₂ O	0,6
6	Citrato de amônio e ferro III	0,6
7	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,1
8	Na ₂ CO ₃	2,0
9	Solução de micronutrientes	-

FONTE: O autor.

TABELA 6 - Composição solução de micronutrientes.

	Substância	Concentração (g L ⁻¹)
1	H ₃ BO ₃	2,86
2	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
3	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
4	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	7,9 x 10 ⁻²

FONTE: O autor.

Na Tabela 7 está apresentado a concentração das soluções de estoque e a quantidade de cada uma adicionada em um balão volumétrico de 1 L para o preparo do meio M-8 modificado e completado com água deionizada, sendo a solução final esterilizada nas mesmas condições que o meio BG-11 (HINTERHOLZ *et al.*, 2019).

TABELA 7 - Composição do meio de cultivo M-8 modificado.

	Soluções	Concentração (g L ⁻¹)	Quantidade em mL adicionado em 2 L
1	Ureia	300	18
2	KH ₂ PO ₄	150	29,6
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	50	1,56
4	FeSO ₄ .7H ₂ O	60	13,02
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	200	12
6	MnCl ₂ .4H ₂ O	39	1,98
7	CuSO ₄ .5H ₂ O	18	0,6
8	ZnSO ₄ .7H ₂ O	50	0,38

FONTE: O autor.

4.1.2 Manutenção das células

As células isoladas e identificadas por Schuelter *et al.* (2019) foram mantidas em placas de Petri contendo uma mistura do meio BG-11 solidificado (1,5% ágar bacteriológico), permanecendo em câmara de germinação (NI-4101 New Lab) a temperatura controlada de 24°C e com iluminação constante de 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A

repicagem das cepas ocorreu a cada 15 dias em placas de Petri contendo meio de cultivo BG-11 sólido previamente preparado.

4.1.3 Cultivo de ativação

Os cultivos de ativação foram realizados em erlenmeyer com capacidade para 125 mL, onde foram adicionados 50 mL de meio de cultivo BG-11, as células da espécie de microalga e 0,15 g de bicarbonato de sódio. Os erlenmeyers ficaram dispostos em incubadora agitadora horizontal (Cienlab), sob agitação de 150 rpm e intensidade luminosa constantes de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 24:00 h (luz:escuro), durante 3 dias.

4.1.4 Cultivo em reatores de coluna

Para o desenvolvimento das células após a fase de ativação e para posterior retirada de alíquotas para a determinação dos parâmetros de cultivo foi utilizado um sistema com reatores de coluna durante 5 dias.

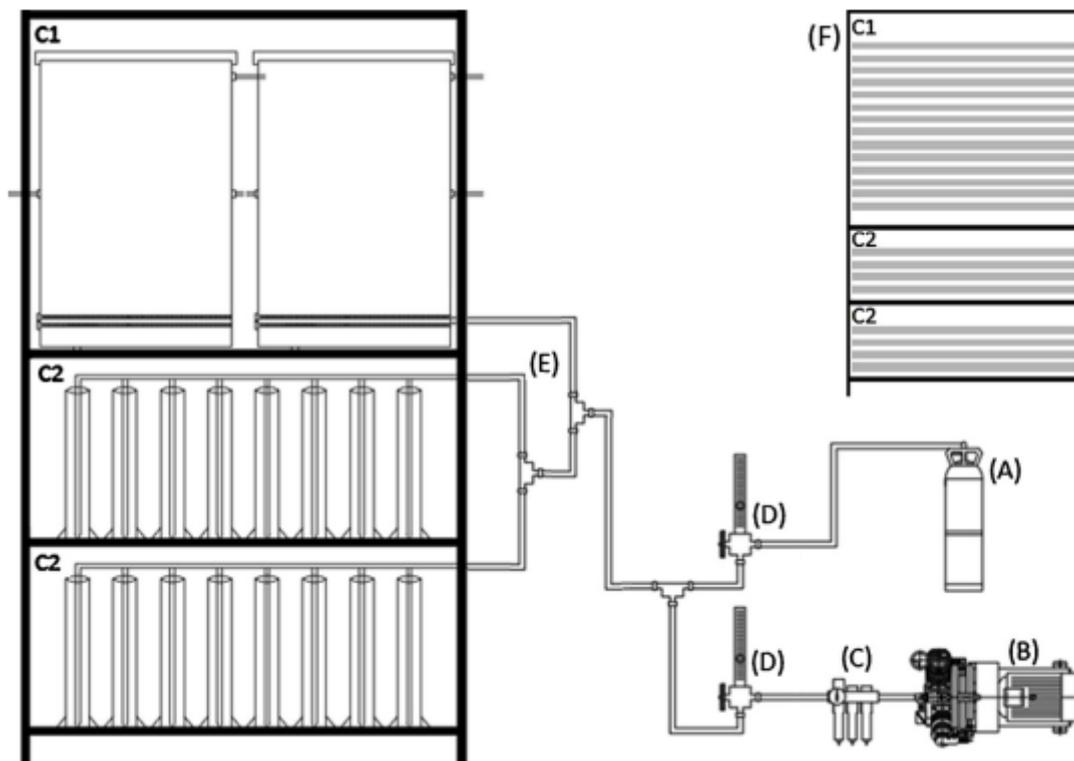
Em proveta de vidro com capacidade volumétrica de 250 mL já autoclavadas, foi adicionado 240 ml de meio de cultivo M-8 modificado, 10 ml do cultivo de ativação, 0,2 ml de anti-espuma e 0,75 g de bicarbonato de sódio.

As provetas foram fechadas com plástico filme e isopor, criado um acesso para a introdução de uma pipeta, e um acesso para inserção de água e nutrientes, quando necessário. Foram colocadas na câmara de cultivo (Figura 12), e uma mangueira (3 mm de diâmetro interno) foi ligada a pipeta. Na câmara de cultivo, foi adicionado uma mistura de ar e CO₂ ao cultivo.

O sistema de iluminação utilizado era constituído por 4 lâmpadas fluorescentes na parte posterior e 4 lâmpadas fluorescentes na parte frontal, sendo de 30 W e 20 W cada, respectivamente. Ambas dispostas horizontalmente, com distância média de 3 cm entre si.

O sistema de injeção de gás era constituído de um compressor de ar isento de óleo e um cilindro de CO₂ comprimido. As correntes de ar e CO₂ passaram por fluxômetros individuais e se uniram antes de serem injetadas nos reatores. No reator, essa mistura de gases era liberada em forma de bolhas, fazendo com que ocorresse agitação no local.

FIGURA 12 – Configuração experimental onde: (A) é o cilindro de CO₂ comprimido; (B) é o compressor de ar isento de óleo; (C) é o filtro bacteriológico triplo; (D) são os medidores de fluxo; (E) são as linhas de gás que alimentam os PBRs; e (F) é o esquema de luz; e C1 e C2 são as câmaras de iluminação.



FONTE: HINTERHOLZ *et al.* (2019).

4.1.5 Cultivo em reator de placa plana

Após os 5 dias de cultivo nos reatores de colunas, adicionou-se 100 ml do cultivo no reator de placas planas de vidro com capacidade de 10 L (Figura 12) juntamente com 10 L de meio M-8 modificado, 30 g de bicarbonato de sódio e 1 ml de anti-espuma. O cultivo se manteve até o estabelecimento da fase estacionária.

O sistema de injeção de gases é igual ao dos reatores em coluna, alterando apenas o sistema de iluminação, onde as lâmpadas na parte posterior são fluorescentes de 30 W e na parte frontal um holofote de 400 W com diodo emissor de luz (LED) colocado próximo ao módulo.

4.1.6 Controle das condições de cultivo

Para a medição da intensidade luminosa foi utilizado um luxímetro digital (modelo LD-400 da Instrutherm), que fornece uma resposta em iluminância (lux). A temperatura foi aferida por meio de um termômetro digital, tipo espeto (Incoterm). E no decorrer do cultivo buscou-se mantê-la entre 30-32°C. O pH foi monitorado por meio de pHmetro de bancada (Lab1000 e modelo mPA210).

O controle da vazão de CO₂ e ar na corrente de entrada foi feito por meio de um rotâmetro. A porcentagem de CO₂ na mistura com o ar foi determinado com o Fyrite Classic Gas Analyzer da Bacharach. A porcentagem de CO₂ durante o cultivo foi fixada em 8%.

4.1.7 Recuperação da biomassa microalgal

Após o cultivo das microalgas, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min, sendo que após a centrifugação, o líquido sobrenadante foi descartado, após a lavagem por 3 vezes com água destilada. Ao final do procedimento, a biomassa foi retirada dos tubos Falcon, transferidas para placas Petri, que levada para estufa a 30°C até a sua secagem completa. Não foi utilizado coagulantes, afim de não haver contaminação da biomassa.

Depois de seca, a biomassa foi triturada e armazenada em Falcon a temperatura de -5°C (em freezer), com o objetivo de manter, desta maneira, as propriedades da biomassa (GRIMA *et al.*, 2003).

4.2 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

4.2.1 Obtenção da concentração celular

Os perfis de varredura da absorvância da microalga em diferentes concentrações foram produzidos, abrangendo de 500 a 800 nm. A partir dos resultados é verificado o comprimento de onda do pico, que será adotado para a determinação da concentração de biomassa.

Foram realizadas diluições de uma suspensão de microalgas com concentração conhecida (0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,13; 0,14; 0,16; 0,17; 0,18 e 0,19 g L⁻¹) a fim de se

determinar a correlação entre a concentração de biomassa e a absorvância da amostra lida em espectrofotômetro (Spectrophotometer UV-1800/Shimadzu) no comprimento de onda obtido.

A concentração celular foi determinada em triplicata pelo método de densidade óptica em espectrofotômetro.

4.2.2 Taxa de Crescimento Específico

O aumento populacional (μ) é representado pela Equação 2 (LEE *et al.*, 2011; JI *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2015b):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

Integrando e rearranjando os termos, tem-se:

$$\mu = \frac{\ln(X/X_0)}{\Delta t} = \frac{\ln x - \ln X_0}{\Delta t} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

Em que:

X: Concentração celular final (g L^{-1}) no tempo t qualquer;

X_0 : Concentração celular inicial (g L^{-1}) no tempo $t=0$;

μ : Taxa de crescimento específico (dia^{-1});

t: Tempo (dia).

4.2.3 Produtividade

A produtividade (P) ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) foi estimada pela Equação 3 (JI *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2015b).

$$P = \frac{X_t - X_0}{(t - t_0)} \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

Em que:

X_0 : Concentração celular inicial do cultivo (g L^{-1});

Xt: Concentração celular final do cultivo (g L^{-1});

t_0 : Tempo inicial do cultivo (dia);

t: Tempo final do cultivo (dia).

4.3 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS QUE COMPÕEM A BIOMASSA

4.3.1 Umidade e matéria seca

O teor de umidade e a matéria seca foram determinadas por análise gravimétrica (SKOOG *et al.*, 2006; LUTZ, 1985), em triplicata. Foi mantido um cadinho na estufa por 2 hora a 105°C , em seguida levado a um dessecador com sílica gel por aproximadamente 1 hora até o completo resfriamento. Pesou-se a massa do cadinho e em seguida adicionou-se a biomassa da microalga entre 100-300 mg e anotou novamente o valor. Foi então levado a estufa a 105°C , monitorando a variação de massa em intervalos de 30 min, até que a massa permanecesse constante. Logo após, foi deixado em dessecador por 1 hora, e em seguida fez a pesagem. A umidade (%) e a matéria seca (%) foram determinadas segundo a Equação 4 e 5, respectivamente.

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \left(\left(\frac{(m_{cad+amostra\ 105^\circ\text{C}} - m_{cad\ vazio})}{m_{amostra\ úmida}} \right) * 100 \right) \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

$$\text{Matéria seca (\%)} = \left(\frac{(m_{cad+amostra\ 105^\circ\text{C}} - m_{cad\ vazio})}{m_{amostra\ úmida}} \right) * 100 \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

Em que:

$m_{cad+amostra\ 105^\circ\text{C}}$: Massa da amostra e do cadinho seco a 105°C (g);

$m_{amostra\ úmida}$: Massa da biomassa utilizada antes da secagem (g);

$m_{cad\ vazio}$: Massa do cadinho vazio seco a 105°C (g).

4.3.2 Teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas, proveniente da biomassa algal foi realizada por análises em triplicata, de acordo com a metodologia proposta pelo Lutz (1985). Para determinação do teor de cinza, os cadinhos contendo as amostras provenientes da

determinação da matéria seca e teor de umidade, foram levados para a mufla a 550°C até queima total da matéria orgânica, por aproximadamente 6 horas. O cálculo do teor de umidade foi realizado de acordo com a Equação 6.

$$\text{Teor de cinza (\%)} = \left(\frac{(m_{cad+amostra\ 550^\circ C} - m_{cad\ vazio})}{(m_{cad+amostra\ 105^\circ C} - m_{cad\ vazio})} \right) * 100 \quad \text{EQUAÇÃO 6}$$

4.3.3 Clorofilas e carotenoides totais

Para a determinação dos teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, realizou-se modificações nas metodologias propostas por Wagner e colaboradores (2016) e Ritchie (2006), que consistiu na coleta de 5mL do cultivo de microalgas, seguido pela centrifugação a 3.500 rpm por 5 min, e conseqüente descarte do sobrenadante. A biomassa foi então lavada com água deionizada e centrifugada novamente. A biomassa residual foi mantida a -15°C por 24 h. Após seu completo descongelamento, adicionou-se 5mL de metanol (99,8%) à amostra, seguido pela agitação em vórtex, e incubação em 4°C por 30 min. Em seguida mistura foi submetida ao banho ultrassônico por 15 minutos, sendo posteriormente centrifugada novamente nas mesmas condições. Repetiu-se o processo até total descoloração da biomassa. O sobrenadante do processo de descoloração foi transferido para um tubo Falcon protegido da luz, e a absorbância mensurada nos seguintes comprimentos de onda: 470; 652,4 e 665,2 nm, contra um branco de metanol (99,8%). Estimou-se a concentração de pigmento ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de acordo com as Equações 7, 8 e 9 para metanol (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001).

$$Cl_a = (16,72 \times A_{665,2}) - (9,16 \times A_{652,4}) \quad \text{EQUAÇÃO 7}$$

$$Cl_b = (34,0 \times A_{652,4}) - (15,28 \times A_{665,2}) \quad \text{EQUAÇÃO 8}$$

$$CT = \frac{((1000 \times A_{470}) - (1,63 \times Cl_a) - (104,96 \times Cl_b))}{221} \quad \text{EQUAÇÃO 9}$$

Em que:

Cl_a : Clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

Cl_b : Clorofila *b* ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

CT: Carotenoides totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

$A_{665,2}$: Absorbância no comprimento de onda de 665,2 nm;

$A_{652,4}$: Absorbância no comprimento de onda de 652,4 nm;

A_{470} : Absorbância no comprimento de onda de 470 nm;

4.3.4 Proteínas brutas

A determinação de proteínas foi realizada utilizando o método Kjeldahl (JUNG *et al.*, 2003; LUTZ, A. 1985). Este método fornece como resposta a matéria nitrogenada total da amostra, que é então convertida na quantidade de proteína. Pesou-se 100 mg de amostra em tubos de ensaio com capacidade para 250 mL e foi adicionado 5 mL de solução digestora no tubo com a amostra. Em seguida os tubos foram colocados no bloco digestor, e a cada 30 min foi alterada a temperatura, obedecendo a seguinte ordem: 50, 100, 150, 250, 350 e 450°C. Ao atingir a digestão completa é possível observar alteração na coloração, ficando a solução em um tom verde claro. Após o resfriamento da solução digerida, adicionou-se aproximadamente 15 mL de água destilada em cada tubo de ensaio, tendo sido efetuada a destilação da seguinte maneira: adicionou-se 10 mL da solução receptora de N em um erlenmeyer com capacidade para 125 mL; acoplou-se o tubo de ensaio com a amostra digerida e a água destilada no equipamento destilador; colocou-se 20 mL de hidróxido de sódio (18 N) no aparelho de destilação; e realizou-se a destilação até o volume do erlenmeyer atingir cerca de 75 mL. Com as amostras digeridas e destiladas realizou-se o procedimento de titulação, onde ácido sulfúrico (0,05 M) foi titulado, até alterar a coloração da solução de verde para rosa e o volume de ácido gasto anotado. A determinação da quantidade de proteínas foi então calculada por meio da Equação 10. Onde, 6, 25 é o fator empírico referente à determinação de proteínas em alimentos.

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \left(\frac{14 \cdot 100 \cdot V \cdot F \cdot N}{m} \right) \cdot 6,25 \quad \text{EQUAÇÃO 10}$$

Em que:

V: Volume de ácido sulfúrico gasto na titulação (mL);

N: Normalidade do ácido;

F: Fator do ácido sulfúrico;

M: Massa da amostra (mg).

A determinação do valor do fator do ácido sulfúrico (Equação 11) é realizada por meio de padronização do ácido sulfúrico. Onde se prepara duas soluções, uma de biftalato de potássio (0,05 N) e outra de hidróxido de sódio (0,05 N), após faz-se duas titulações.

- 1ª titulação: colocar 100 mL de NaOH e 2 gotas de indicador de fenolftaleína em um erlenmeyer e titular com biftalato de potássio (0,05 N).
- 2ª titulação: colocar 10 mL H₂SO₄ e 2 gotas de indicador de fenolftaleína em um erlenmeyer e titular com NaOH (0,05 N).

$$F = \frac{FB}{10} * FH \quad \text{EQUAÇÃO 11}$$

Em que:

F: Fator do ácido sulfúrico;

FB: Volume de biftalato titulado (mL);

FH: Volume de NaOH titulado (mL).

4.3.5 Fibras brutas

A determinação das fibras totais ocorreu de acordo com a metodologia proposta por (LUTZ, 1985). Pacotes plásticos de 200 mL foram pesados e em seguida adicionou-se 1 g de biomassa e 200 mL de hexano, permanecendo em repouso por 5 minutos. Em seguida, álcool etílico foi burrificado dentro dos pacotes. Os pacotes foram levados para estufa à 105°C até peso constante. Logo depois, os pacotes foram fechados e introduzidos no determinador de fibras, as quais foram totalmente cobertas com ácido sulfúrico (1,25%). Os pacotes permaneceram no aparelho por 30 minutos à 90° C. Posteriormente a este procedimento, foram realizadas 2 lavagens sucessivas nos pacotes com água deionizada fervente. Repetiu-se o procedimento com ácido sulfúrico e duas lavagens. 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, deixados esfriar em dessecador e posterior pesagem. O cálculo da fibra total foi realizado de acordo com a Equação 12.

$$\text{Fibra bruta (\%)} = \frac{(A-T)*100}{P} \quad \text{EQUAÇÃO 12}$$

Em que:

A: Peso do pacote + resíduo (g);

T: Peso do pacote (g);

P: Peso da amostra de biomassa (g).

4.3.6 Carboidratos totais

A quantidade de carboidratos totais foi determinada por diferença, ou seja, os dados obtidos nas análises de umidade, teor de cinzas, proteínas, fibras totais e lipídios foram utilizados mediante a aplicação da Equação 13. Para o teor de lipídeos foi utilizado o valor encontrado pelo método Bligh e Dyer com ajuda de ultrassom, o qual conseguiu extrair o maior percentual de lipídios presentes na biomassa.

$$\text{Carboidratos totais (\%)} = 100 - (\text{Umid} + \text{Cinza} + \text{Prot} + \text{Fibra} + \text{Lip}) \quad \text{EQUAÇÃO 13}$$

Em que:

Umid: Teor de Umidade (%);

Cinza: Teor de cinzas (%);

Prot: Teor de Proteínas (%);

Fibra: Teor de Fibra bruta (%);

Lip: Teor de Lipídios (%).

4.4 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS

Para a extração dos lipídios foi testado métodos com solventes a frio, método com o soxhlet, método a quente sucessivo e extração supercrítica. Os métodos foram feitos em triplicada, exceto o supercrítico que seguiu um planejamento experimental. O rendimento (%), expresso em gramas de lipídios totais por grama de biomassa seca, foi calculado por análise gravimétrica.

4.4.1 Método Bligh e Dyer (2:2:1,8) – BDI

Pesou-se aproximadamente 1 g de amostra de biomassa da microalga em um becker, colocou-se também 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água. Para evitar

a evaporação dos solventes, fechou-se o Becker com plástico filme. A solução foi agitada em agitador magnético por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de uma solução 10 % em peso de sulfato de sódio, agitou-se por mais 2 minutos. A solução foi então transferida para um funil de separação, dentro do qual, as duas fases (clorofórmio + lipídeos e metanol + água) são separadas. A fase de baixo (fase mais escura) é coletado e, a ele, foram adicionados mais 1 g de sulfato de sódio anidro. A solução foi então filtrada e transferida para um tubo de ensaio previamente pesado e levado para evaporação em estufa. A proporção clorofórmio:metanol:água nessa metodologia é 2:2:1,8 (BLIGH & DYER, 1959).

4.4.2 Método Bligh e Dyer (2:2:1,8) com ultrassom – BDI-ULTRA

Utilizou-se a metodologia do método Bligh e Dyer descrito anteriormente (tópico 4.10.1), alterando apenas o momento da agitação magnética, que o becker com a mistura foi levado ao banho de ultrassom de 40khz por 20 minutos (ARAUJO *et al.*, 2013).

4.4.3 Método Bligh e Dyer (2:2:1) – BD2

Foi alterado nesse método a quantidade de água adicionado no início da extração. Adicionando-a, apenas após os 20 minutos de agitação, 10 mL em solução com o sulfato de sódio a 10% em peso. A proporção clorofórmio:metanol:água nessa metodologia é 2:2:1.

4.4.4 Método Bligh e Dyer (5,7:3:1) – BD3

Em um béquer foi adicionado aproximadamente 1 g de biomassa algal, 11,4 mL clorofórmio e 6 mL de metanol. Fechou-se o béquer com plástico filme e agitou-se por 90 minutos. Em seguida adicionou 2 mL de água deionizada em solução com sulfato de sódio 10% e agitou por mais 2 min. Transferiu para um balão de separação. Remover a parte de baixo, e adicionou 1 g de sulfato de sódio. A solução foi então filtrada e transferida para um tubo de ensaio previamente pesado e levado para evaporar em estufa. A proporção clorofórmio:metanol:água nessa metodologia é 5,7:3:1 (ZORN *et al.*, 2017).

4.4.5 Método Bligh e Dyer (5,7:3:1) com ultrassom – BD3-ULTRA

Utilizou-se a mesma metodologia do tópico 4.10.4, deixando a mistura em banho de ultrassom em vez da agitação magnética pelos 90 minutos de extração.

4.4.6 Método Hara e Radin – HRI

Em um béquer foi adicionado 45mL de n-hexano e 30 mL de isopropanol e aproximadamente 1 g de biomassa microalgal. Colocou para agitação magnética por 7,5 horas. Em seguida, filtrou a mistura e adicionou 10 mL de hexano e 10 mL de água na parte filtrada. Separou as camadas com ajuda de um balão de separação. Coletou-se a camada verde escura, e levou-se para secagem em estufa (HARA & RADIN, 1978).

4.4.7 Método Hara e Radin modificado – HRI-MOD

Utilizou-se a mesma metodologia de Hara e Radin todavia, utilizou o n-hexano como solvente único dessa extração. Adicionou-se 75 mL do álcool para 1 g de biomassa algal (HALIM *et al.*, 2011).

4.4.8 Método Fajardo e colaboradores – FAJARDO

Nesse experimento 1g de biomassa foi tratada com 50 mL de etanol (96%) em um recipiente de 250 mL com agitação magnética constante por 24 h em temperatura ambiente. A mistura obtida foi então filtrada e o resíduo de biomassa foi lavado com 2x25 mL de etanol. Depois, adicionou-se 6 mL de água a 10mL do extrato obtido anteriormente. Em seguida, adicionou-se 3,2 mL de hexano, formando um sistema bifásico. Recolheu-se a parte do hexano, e a parte hidroalcolica foi adicionado 4 vezes o volume de 3,2 mL de hexano, e coletado a fase do hexano após separação de fase (FAJARDO *et al.*, 2007).

4.4.9 Método Folch e colaboradores – FOLCH

Em temperatura ambiente adicionou 1g de microalga em 20 mL clorofórmio e 10 mL de metanol, agitou-se por 20 minutos. Em seguida filtrou-se a mistura e no filtrado adicionou-se 8 mL de água deionizada. Decantou em balão de separação e após separar as

fases recolheu a parte mais escura. O líquido foi levado para secar em estufa a 50°C. A proporção clorofórmio:metanol:água nessa metodologia é 2:1:0,8 (FOLCH *et al.*, 1957).

4.4.10 Método Chen e colaboradores – FOLCH-MOD

A metodologia de Chen e colaboradores (1981), consiste na mesma metodologia de Folch e colaboradores (1957), substituindo apenas o solvente clorofórmio por diclorometano.

4.4.11 Método soxhlet

Pesou-se 1 g de biomassa e inseriu dentro de um cartucho de papel filtro e acomodou dentro do aparelho soxhlet. Adicionou 150 mL de solvente dentro do balão, previamente pesado, e montou-se o modulo de extração via soxhlet (Figura 9). A temperatura de aquecimento para cada solvente foi a temperatura de ebulição, e a temperatura do condensador se manteve em 5°C. O tempo de cada extração foi de 6,5 h. Logo depois, os solventes foram evaporados em rota-evaporador e os balões levados para secar em estufa, após secos por completo, foi levado ao dessecador até esfriar, e em seguida os balões foram pesados novamente. Foi utilizado os solventes Hexano, Etanol, Diclorometano e Éter Etílico (BHUYAR *et al.*, 2021).

4.4.12 Método extração sucessiva

Em tubos Falcon foi adicionado 1 g de biomassa algal e 10 mL de solvente. O tubo foi fechado e colocado em sob agitação 200 rpm e temperatura de 60°C durante 30 minutos. Logo após, foi centrifugado por 5 minutos em 3500 rpm. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um balão previamente pesado, e com a biomassa foi feita mais 6 extrações. No final o balão foi evaporado em rota-evaporador, e levado para finalizar a secagem em estufa a 60°C. Utilizou os solventes Etanol, Hexano, Diclorometano, Éter Etílico e a mistura metanol e clorofórmio. (CHEN *et al.*, 2012).

4.4.13 Método extração supercrítica

As extrações supercríticas utilizando dióxido de carbono como solvente e etanol como cossolvente, foram realizadas usando uma unidade básica extração supercrítica Speed, equipada com um leito de aço inoxidável de 24 cm³ (1,42 cm de diâmetro e 15 cm de altura) preenchido com aproximadamente 5 g de biomassa da microalga *Poteroochromonas malhamensis* em cada experimento. As extrações avaliaram os efeitos da temperatura (40, 50 e 60°C) e pressão (20, 25 e 30 MPa) no rendimento do óleo. Após 30 min de período estático nas condições de temperatura e pressão acima mencionadas, uma vazão mássica de CO₂ de aproximadamente 3 g min⁻¹ foi introduzida, controlada pela abertura da válvula micrométrica, e verificada no medidor de vazão na saída da unidade. O lipídio foi extraído de maneira dinâmica e foi coletado em frascos devidamente já pesados e sua massa foi determinada em tempos por análise gravimétrica. Foi utilizado como cossolvente na extração o álcool etanol na proporção de 5% em relação ao CO₂, a razão massa de etanol por biomassa foi de aproximadamente 6,68 ± 0,05 g g⁻¹.

4.4.14 Análise dos ésteres de ácidos graxos das extrações

Para análise de perfil dos ácidos graxos presente nos lipídios extraídos das microalgas, necessita-se realizar o processo de derivatização, que consiste em transformar os ácidos graxos em componentes com maior volatilidade, tais como os ésteres metílicos.

A metodologia empregada para a derivatização foi a proposta por Hartmann e Lago (1973). Em um tubo de ensaio contendo 100 mg do produto líquido, foram adicionados 2 mL da solução de hidróxido de sódio em metanol a 0,5 mol L⁻¹. O tubo foi aquecido em um banho termostático a 90°C por 5 minutos e após um rápido resfriamento em água corrente, foram adicionados 3 mL do agente de esterificação, que consistiu em uma mistura de 33,33g de cloreto de amônio, 50ml de ácido sulfúrico em um litro de metanol. Aqueceu-se a amostra por 3 minutos a 90°C. Para que ocorresse a separação das fases foram adicionados 2 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio e, por fim foram adicionados 3 mL de iso-hexano. O sobrenadante foi utilizado para análise do óleo por cromatografia em fase gasosa.

As análises em GC-MS foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas – COMCAP, Universidade Estadual de Maringá (UEM). As análises foram realizadas em um sistema CG-MS Thermo-Finigan, um em um

sistema composto por um cromatógrafo em fase gasosa FOCUS GC (Thermo Electron), acoplado a um espectrômetro de massas DSQ II (Thermo Electron). Os componentes foram identificados de acordo com a massa de seus íons na biblioteca do equipamento.

4.5 BIODIESEL

4.5.1 Reação de transesterificação *in situ*

Pesou-se aproximadamente 0,02 g de amostra de biomassa da microalga seca em um tubo de ensaio de 10 mL que possui fundo redondo, colocou-se também 3 mL da mistura de solvente:catalisador:cossolvente (sendo o volume do solvente e do catalisador utilizado no planejamento experimental listado na Tabela 9, o valor do cossolvente utilizado foi de 5 mL - determinado no tópico 5.8.3), em seguida fechou os tubos de ensaio e levou ao banho maria a temperatura e tempo determinado no experimento. Após decorrido o tempo do experimento, foi retirado os tubos de ensaio do banho maria e colocado em um béquer com gelo para interromper a reação.

Depois que os tubos de ensaios estavam em uma temperatura menor que a ambiente, foi adicionado 1 mL de água destilada e 2 mL da mistura de hexano e clorofórmio nas proporções (4:1). Agitou-se vigorosamente e esperou-se a separação de fases, a seguir recolheu o sobrenadante em novos tubos de ensaios previamente pesados e anotados suas respectivas massas. Repetiu-se o processo de adicionar a mistura de hexano e clorofórmio por mais 2 vezes. Para finalizar, os tubos de ensaio com o sobrenadante (biodiesel) foram levados para evaporação em estufa com fluxo de ar a 60°C até peso constante.

Seguidamente foi adicionado em cada tubo 1,5 mL grau HPLC de n-heptano e 0,01 mL solução de padrão C17:0. Agitou-se a mistura e foi transferido o líquido para vial e mantido em -5°C até o processo de leitura em cromatografia gasosa (LEWIS *et al.* 2000).

O rendimento do biodiesel e ésteres de ácidos graxos foi calculado de acordo com a Equação 14 e 15. Para investigar a eficiência da reação de transesterificação direta, o rendimento de conversão de ésteres foi calculado na Equação 16, cujo teor de ácidos graxos da biomassa foi medido de acordo com o método sucessivo, descrito no tópico 4.4.12.

$$\text{Rendimento em biodiesel (\%)} = \left(\frac{\text{Peso do biodiesel}}{\text{Peso da biomassa seca}} \right) * 100 \quad \text{EQUAÇÃO 14}$$

$$\text{Rendimento em ésteres (\%)} = \left(\frac{\text{Peso total dos ésteres (FAME)}}{\text{Peso da biomassa seca}} \right) * 100 \quad \text{EQUAÇÃO 15}$$

$$\text{Rendimento em conversão de ésteres (\%)} = \left(\frac{\text{Rendimento em ésteres}}{\text{Teor de ésteres presente na biomassa}} \right) * 100 \quad \text{EQUAÇÃO 16}$$

Em que:

Rendimento em Biodiesel: $g_{\text{biodiesel}} g_{\text{biomassa}}^{-1}$;

Rendimento em Ésteres de ácidos graxos: $g_{\text{ésteres}} g_{\text{biomassa}}^{-1}$;

4.5.2 Planejamento experimental

As reações de transesterificações direta foram realizadas a partir de um planejamento experimental Box-Behnken construído para o estudo de três fatores (q_1 ; q_2 e q_3), em três níveis (alto (+1); médio (0) e baixo (-1)).

Assim, investigou-se o rendimento em biodiesel e o rendimento em FAME (ésteres de ácidos graxos) obtidos sob as variações da temperatura ($^{\circ}\text{C}$; q_1); quantidade de catalisador (HCl) (volume, q_2) e quantidade de solvente (álcool metílico) (volume; q_3). Conforme os valores apresentados na Tabela 8, as variáveis independentes foram estabelecidas a partir de dados da literatura.

TABELA 8 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental

Variável	Coeficiente	Nível		
		-1	0	+1
Temperatura	q_1 ; $^{\circ}\text{C}$	40	65	90
Catalisador (HCl)	q_2 ; volume	0,05	0,25	0,45
Solvente (Metanol)	q_3 ; volume	0,5	2,5	4,5

Quinze reações de transesterificação *in situ* – sendo doze em condições únicas e 3 na condição central do planejamento. As condições empregadas em cada transesterificação são apresentadas na Tabela 9. Os parâmetros como tempo de reação, quantidade de cossolvente e teor de água na biomassa foram determinados por testes preliminares (tópico 5.8.1; 5.8.2 e 5.8.3).

TABELA 9 - Reações de transesterificação in situ realizadas por planejamento Box-Behnken

Reação	Variável independente ^(a)		
	q ₁ ; °C Temperatura	q ₂ ; volume Catalisador	q ₃ ; volume Solvente
1	40 (-1)	0,05 (-1)	2,50 (0)
2	90 (+1)	0,05 (-1)	2,50 (0)
3	40 (-1)	0,45 (+1)	2,50 (0)
4	90 (+1)	0,45 (+1)	2,50 (0)
5	40 (-1)	0,25 (0)	0,50 (-1)
6	90 (+1)	0,25 (0)	0,50 (-1)
7	40 (-1)	0,25 (0)	4,50 (+1)
8	90 (+1)	0,25 (0)	4,50 (+1)
9	65 (0)	0,05 (-1)	0,50 (-1)
10	65 (0)	0,45 (+1)	0,50 (-1)
11	65 (0)	0,05 (-1)	4,50 (+1)
12	65 (0)	0,45 (+1)	4,50 (+1)
13 ^(b)	65 (0)	0,25 (0)	2,50 (0)
14 ^(b)	65 (0)	0,25 (0)	2,50 (0)
15 ^(b)	65 (0)	0,25 (0)	2,50 (0)

(a) Os valores codificados das variáveis são apresentados entre parênteses;

(b) Referem-se as reações de transesterificação direta replicados no nível médio das variáveis independentes.

4.5.3 Análise dos ésteres de ácidos graxos

Os ésteres metílicos foram separados por GC-FID Clarus 680 (PerkinElmer, EUA) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar cianopropila (100 m × 0,25 mm). A coluna de separação de FAME usada para as amostras de ésteres teve uma temperatura programada de 80°C (permanecendo por 1 min), seguida de aquecimento em uma rampa de temperatura de 15°C min⁻¹ até uma temperatura de 180°C. Em seguida, foi aquecida para 220°C, com a rampa de 3°C min⁻¹ (permanecendo por 2 min) e, finalmente, uma rampa de 5°C min⁻¹ até atingir 250°C (permanecendo por 5 min). Hélio foi utilizado como gás transportador (1,0 mL min⁻¹) e hidrogênio e ar sintético como gases de chama (40 mL min⁻¹ e 400 mL min⁻¹, respectivamente). As áreas de pico foram

determinadas pelo software TotalChrom. Para identificação de FAME, os tempos de retenção foram comparados com os dos ésteres metílicos padrão. Análise quantitativa foi realizada a partir do Heptadecanoato de metila como padrão interno (17:0).

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Os perfis de varredura da absorbância (500 a 800 nm) da cultura da microalga *Poteroiochromonas malhamensis* nas concentrações 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,13; 0,14; 0,17; 0,18; 0,19 g L⁻¹, são apresentados na Figura 13. Com base nesses resultados foi verificado que o pico, a qual posteriormente será usado para identificação da concentração celular, se localiza no comprimento de onda em 687 nm.

Um ajuste linear entre os dados da absorbância no comprimento de onda em 687 nm e a concentração foi realizado, representado pela Equação 17, obtendo um $R^2 = 0,998$ assim sugerindo que a reta de regressão é uma representação muito próxima dos dados, a qual foi utilizada para medir diariamente o crescimento microalgal.

FIGURA 13- Perfis de varredura da absorbância para determinadas concentrações.

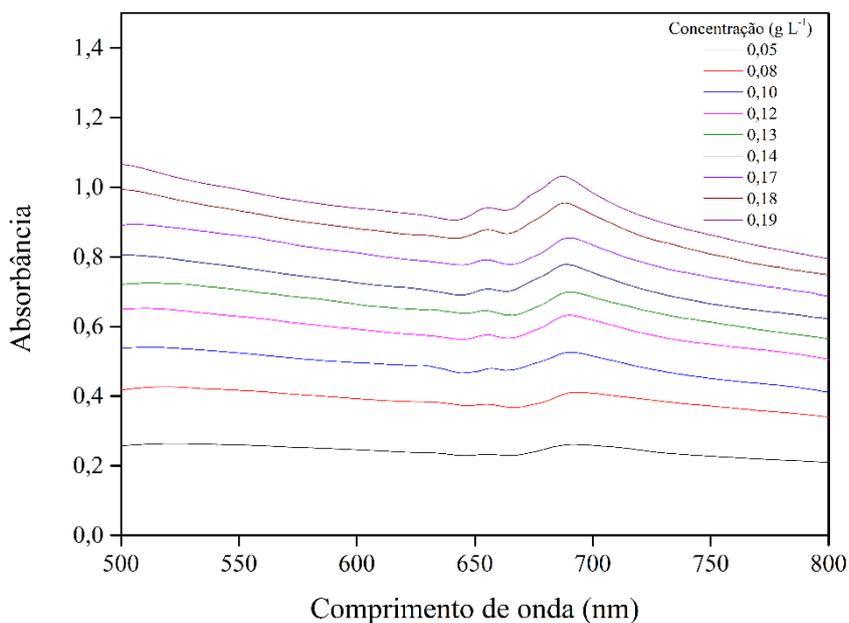
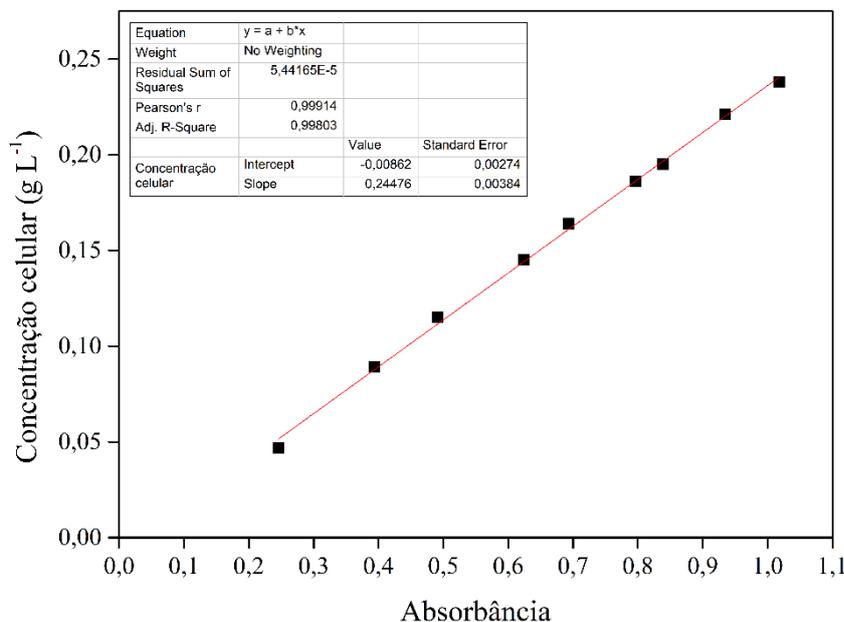


FIGURA 14 – Curva de regressão entre a concentração da biomassa (g L^{-1}) e a absorvância no comprimento de onda em 687 nm.



$$\text{Concentração (g L}^{-1}\text{)} = (0,24476 * \text{Absorvância}) - 0,00862 \quad \text{EQUAÇÃO 17}$$

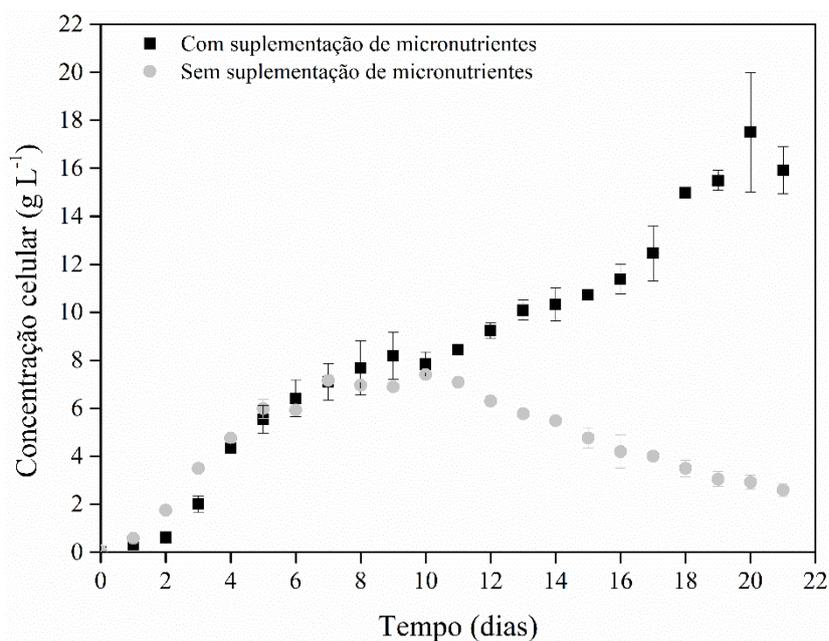
5.2 SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

O cultivo da *Poteroiochromonas malhamensis* ocorreu durante 21 dias, sem a adição suplementar de macro e micronutrientes, e obteve um valor de concentração celular máxima de $7,41 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ no 10º dia de cultivo (Figura 15). No decorrer do cultivo, o pH permaneceu na faixa de $7,80 \pm 0,23$ evidenciando que, o crescimento fotoautotrófico gera elevação de pH, por meio do íon bicarbonato se desintegrando para consumo na fotossíntese, porém com o fornecimento de uma vazão de CO_2 o pH tende a se estabilizar, como o ocorrido. A quantidade de CO_2 permaneceu em 8% durante todo cultivo, e sua vazão unida com o ar, também permaneceu constante em $1,46 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A temperatura média durante o cultivo foi de $28,40 \pm 1,05 \text{ }^\circ\text{C}$, obtendo no 16º e no 17º dia o valor máximo de $29,25^\circ\text{C}$, e no 2º e 6º dia o valor mínimo de $27,25^\circ\text{C}$. A média da intensidade luminosa foi de $260,05 \pm 26,39 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na face frontal e de $84,89 \pm 4,02 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na face posterior (Anexo A).

Quando suplementado com micronutrientes (no 8º e 14º dia), a concentração celular do cultivo atingiu o valor de $17,50 \pm 2,49 \text{ g L}^{-1}$ no 20º dia (Figura 15), tornando o cultivo

uma cultura de ultra alta densidade (UHDC), valor semelhante com os encontrados por Hinterholz *et al.* (2019). A temperatura e pH do cultivo permaneceu em média $29,49 \pm 1,86$ e $7,31 \pm 0,10$ respectivamente. Já a Intensidade luminosa com LED e com lapadas fluorescentes foram de $471,07 \pm 77,41$ e $119,21 \pm 19,33 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente. A vazão da mistura de gases permaneceu em média $1,20 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e a concentração de CO_2 em 8% até o final do cultivo (Anexo B).

FIGURA 15 - Crescimento celular da *Poterioochromonas malhamensis* (g L^{-1}) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.



Como é observando a partir do 12º dia uma clara diferença na concentração de biomassa entre o cultivo com e sem suplementação de micronutrientes, realizou-se a ANOVA apenas para a variável resposta estuda concentração celular do 1º até 11º dia de cultivo, cujo resultado aponta diferença em pelo menos um dia do cultivo ($p < 0,10$) (Tabela 10). Assim, as médias estatisticamente diferentes foram determinados para a variável estudada, utilizando Tukey. De acordo com os resultados do teste de Tukey (Figura 16), quando comparado o experimento com micronutrientes e o sem micronutrientes, em cada dia de cultivo, apenas no 2º, 4º e 7º dia não houve diferença estatística entre o cultivo com e sem suplementação, nos outros dias houve diferença em pelo menos um fator. Dessa forma, podemos afirmar que há diferença estatística entre os valores de concentração celular entre os cultivos com início no 8º dia (em pelo menos um fator até o 11º dia) e continuando até o final do cultivo, demonstrando que, a reposição de

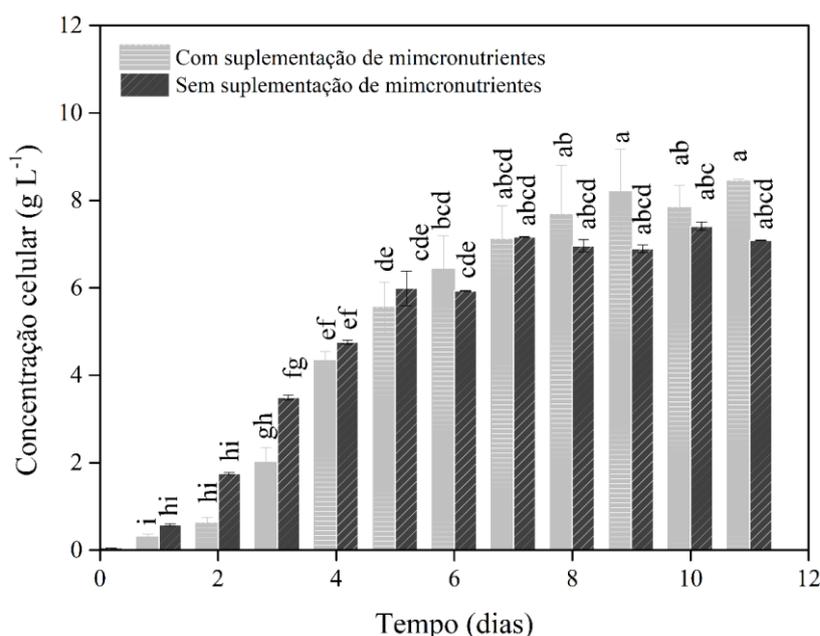
micronutrientes no cultivo da *Poteroiochromonas malhamensis* ocasiona uma elevação na produção de biomassa durante o cultivo.

TABELA 10 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta concentração de biomassa estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	1234,496	1	1234,496	6221,702	0,000
Resíduos	298,577	21	14,218	71,657	0,000

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de biomassa ($N = 2$) estimados nos 11 primeiros dias de cultivos das *microalgas P. malhamensis* com e sem a adição suplementar de micronutrientes.

FIGURA 16 – Teste de Tukey para a concentração de *P.malhamensis* com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.



Ao observar a curva de crescimento com os dados da taxa de crescimento específico (Tabela 11) nota-se que para o cultivo sem suplementação de micronutrientes, o 10º dia configura-se a fase estacionária, e após esse dia inicia-se a fase lise (declínio), logo os valores relacionados com a taxa de crescimento específico a contar desta data, são negativos, em decorrência da diminuição do crescimento microalgal. A fase exponencial (ou crescimento logarítmico) ocorre quando é atingido o maior valor para o crescimento específico, e nesse cultivo ocorreu no 2º dia, com valor de $1,105 \pm 0,027 \text{ dia}^{-1}$. Para o

cultivo com suplementação, temos a fase exponencial no 3º dia, com o valor de crescimento específico máximo de $1,181 \pm 0,040 \text{ dia}^{-1}$. Nota-se que no 10º dia há uma diminuição da concentração de biomassa onde iniciaria a etapa de declínio do cultivo, porém com adição de micronutrientes (adicionado no 8º e 14º dia) o cultivo volta a crescer e reloca a fase estacionária para o 20º dia. Dessa maneira, constata-se que o cultivo da *Poteroochromonas malhamensis* em meio M-8 modificado, sobrevive em média 10 dias sem suplementação de nutrientes, e para obter um cultivo com maior densidade de biomassa, há a necessidade de repor os micronutrientes que foram consumidos até o 10º dia.

Os valores encontrados para a taxa de crescimento específico máximo, utilizando como base de cálculo a fase exponencial, obteve como resultados $1,436 \pm 0,132 \text{ dia}^{-1}$ para cultivo com suplementação (0-3 dia). Wahidin *et al.* (2013) alcançaram o valor de $0,264 \text{ dia}^{-1}$, utilizando $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, fotoperíodo de 24:00 com a microalga *Nannochloropsis* sp. Gong & Huang (2020) obtiveram o crescimento específico (dia^{-1}) na fase exponencial de $0,53 \pm 0,05$ para *Selenastraceae* sp., $0,91 \pm 0,02$ para *Scenedesmus* sp., $0,66 \pm 0,03$ para *Pectinodesmus* sp. e $0,42 \pm 0,04$ para *Chlorella Rotunda*, sendo todas cultivadas por 14 dias com $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminação contínua e 30 g L^{-1} de glicose em meio. Esses resultados indicam que em situações não limitantes de nutrientes a *P. malhamensis* possui uma alta taxa de crescimento específico quando comparada com outras microalgas. Em 14 dias a *P. malhamensis* atingiu $10,331 \pm 0,684 \text{ g L}^{-1}$ de concentração de biomassa, valores maiores aos obtidos por Gong & Huang (2020) para *Selenastraceae* sp. ($6,14 \pm 0,57 \text{ g L}^{-1}$), *Pectinodesmus* sp. ($5,10 \pm 1,06 \text{ g L}^{-1}$) e para *Chlorella Rotunda* ($1,88 \pm 0,34 \text{ g L}^{-1}$).

Os valores encontrados para produtividade são maiores para o cultivo com suplementação, onde obteve-se $2,330 \pm 0,128$ e $2,535 \pm 0,964 \text{ g L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ no 4º e 18º dia respectivamente, e para o cultivo sem suplementação o valor máximo de produtividade encontrado ocorreu no 3º e 4º dia com valor de $1,746 \pm 0,032 \text{ g L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ e $1,259 \pm 0,008 \text{ g L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ (Tabela 11). A produtividade utilizando apenas o período exponencial (0-3 dias) para o cultivo com suplementação de micronutrientes foi de $0,661 \pm 0,113 \text{ g L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ valor maior ao obtido por Nascimento *et al.* (2013) de $0,32 \text{ g L}^{-1}\text{dia}$ com a *Chlamydocapsa bacillus* cultivada com 2% CO_2 , $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

TABELA 11 - Taxa de crescimento específico e produtividade para o cultivo da *P. malhamensis* durante 21 dias com e sem suplementação de micronutrientes

Intervalo (dias)	Taxa de crescimento específico (dia ⁻¹)		Produtividade da biomassa (g L ⁻¹ dia ⁻¹)	
	Com	Sem	Com	Sem
	suplementações micronutrientes	suplementações micronutrientes	suplementações micronutrientes	suplementações micronutrientes
1	2,398±0,000	2,398±0,000	0,272±0,062	0,528±0,021
2	0,728±0,437	1,105±0,027	0,319±0,195	1,172±0,000
3	1,181±0,040	0,691±0,003	1,390±0,206	1,746±0,032
4	0,776±0,119	0,307±0,006	2,330±0,128	1,259±0,008
5	0,244±0,057	0,229±0,076	1,208±0,373	1,229±0,445
6	0,145±0,016	-0,008±0,068	0,874±0,195	-0,055±0,406
7	0,103±0,013	0,189±0,000	0,690±0,007	1,236±0,000
8	0,074±0,039	-0,029±0,019	0,567±0,359	-0,207±0,135
9	0,067±0,028	-0,010±0,034	0,517±0,153	-0,066±0,236
10	-0,042±0,053	0,072±0,026	-0,357±0,460	0,514±0,188
11	0,075±0,060	-0,045±0,012	0,600±0,464	-0,326±0,086
12	0,089±0,030	-0,117±0,011	0,793±0,281	-0,780±0,068
13	0,089±0,005	-0,089±0,006	0,859±0,083	-0,536±0,030
14	0,023±0,025	-0,051±0,002	0,241±0,273	-0,286±0,015
15	0,039±0,070	-0,143±0,107	0,397±0,728	-0,719±0,521
16	0,059±0,050	-0,132±0,074	0,662±0,572	-0,568±0,255
17	0,088±0,037	-0,041±0,174	1,062±0,516	-0,194±0,724
18	0,187±0,080	-0,135±0,009	2,535±0,964	-0,504±0,038
19	0,033±0,016	-0,138±0,000	0,510±0,254	-0,451±0,000
20	0,117±0,115	-0,043±0,000	2,003±2,064	-0,127±0,000
21	-0,091±0,081	-0,122±0,000	-1,583±1,501	-0,334±0,000

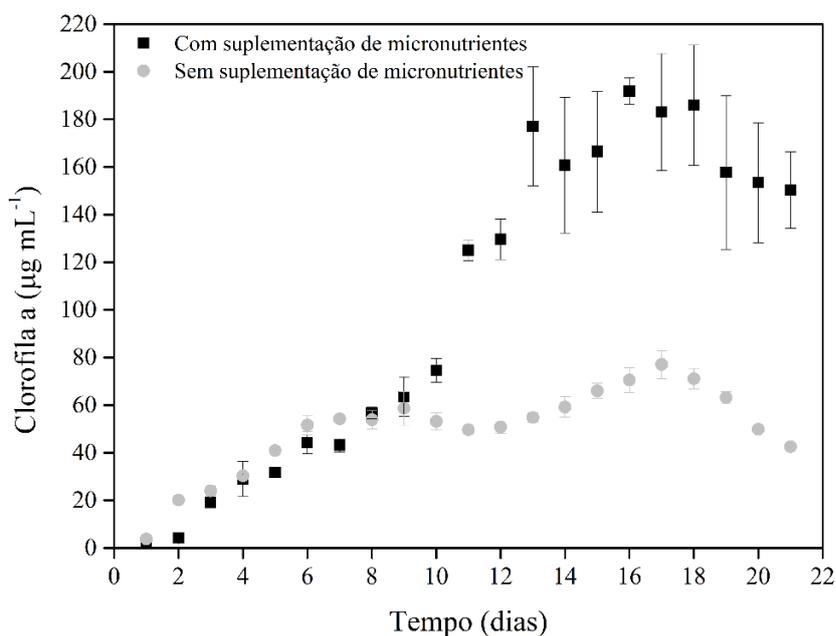
5.3 SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

5.3.1 *Clorofila a*

O maior teor de clorofila *a* obtido no experimento com suplementação extra de micronutrientes, ocorreu no 16º dia do cultivo, com valor de 191,837±5,595 µg mL⁻¹. Já

para o cultivo que não recebeu micronutrientes extra, seu maior valor foi de $77,086 \pm 5,903 \mu\text{g mL}^{-1}$ encontrado no 17º dia (Figura 17). Realizou-se a ANOVA para variável resposta clorofila *a*, apontando diferença estatística em pelo menos um dos valores ($p < 0,10$) (Tabela 12). Dessa maneira, as médias estatisticamente diferentes foram determinados para a variável estudada, utilizando Tukey. Pelo teste de Tukey (Figura 18), as médias de clorofila *a* com início no 11º dia até o final do cultivo são estatisticamente diferentes entre os cultivos com e sem suplementação de micronutrientes. Antes do 11º dia, há semelhança estatística em pelo menos um fator. No cultivo com suplementação, o valor máximo (16º dia) não se difere estatisticamente pelo menos um fator dos dados obtidos por esse mesmo cultivo do 13º ao 19º dia. Assim sendo, podemos afirmar que há diferença estatística entre os valores de clorofila *a* entre os cultivos com início no 11º dia, e com o aumento da biomassa ocasionado pela adição extra de micronutrientes, houve também um aumento na produção de clorofila *a* em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FIGURA 17 - Teor de Clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.



Babadi *et al.* (2020) cultivou *C. humicolafoi* por 15 dias sob iluminação contínua de 10.000 lux ($135 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e aeração a 0,8 vvm, e alcançou $4,50 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofila *a*, na extração com éter dimetil. Da mesma forma, Morcelli *et al.* (2021) em seu trabalho utilizando extração supercrítica com CO_2 e etanol ($55,8^\circ\text{C}$, 257,7 bar e 7,9% (v/v) de etanol), alcançou $6,15 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofila *a* extraídos da microalga *Chlorella*

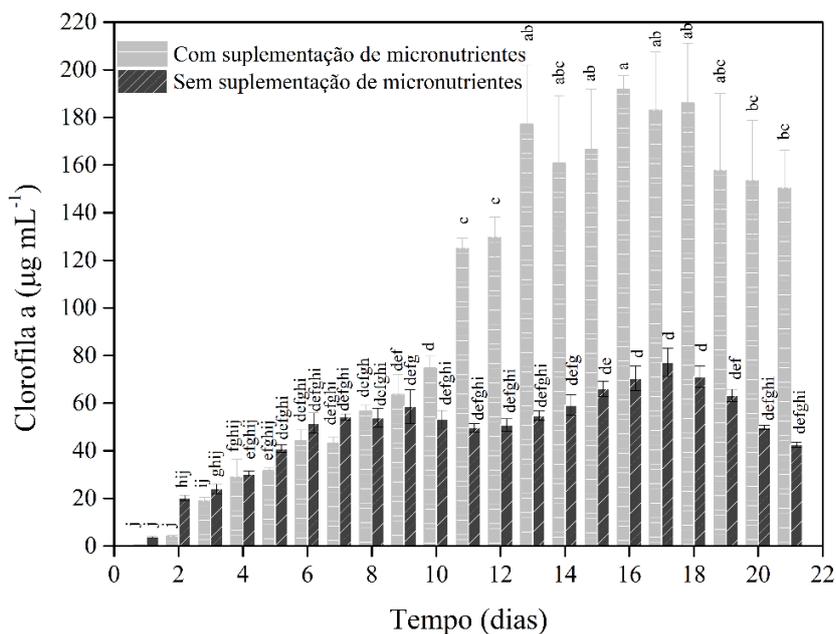
sorokiniana. Sarkar *et al.* (2020) utilizando a *Chlorella Thermophila* obteve aproximadamente $8,64 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofila *a* utilizando uma agitação de 10.000 rpm em 4°C durante 12 minutos. Valores bem abaixo ao encontrado tanto para o cultivo com e sem micronutrientes extra, ao qual atingiu $15,52 \pm 2,37 \text{ mg g}^{-1}$ e $13,85 \pm 0,67 \text{ mg g}^{-1}$ no período de 15 dias. Valores de clorofila *a* em mg/g presente no Anexo C.

TABELA 12 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta clorofila *a* estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	383642,9	41	9357,1	67,817	0,00
Resíduos	11590,0	84	138,0		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de clorofila *a* ($N = 3$) estimados nos 21 dias de cultivos das *microalgas P. malhamensis* com e sem a adição suplementar de micronutrientes.

FIGURA 18 - Teste de Tukey para a teor de clorofila *a* em um cultivo com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.



5.3.2 Clorofila *b*

Na Figura 19 é apresentado os valores encontrados para clorofila *b* durante o cultivo da microalga *P. malhamensis* durante 21 dias de cultivo, com suplementação no 8º e 14º dia com micronutrientes e sem a suplementação. Realizou-se a ANOVA, e o resultado

obtido foi ($p < 0,10$) (Tabela 13), indicando que há diferença estatística em pelo menos um dos valores encontrados. O teste de Tukey (Figura 20) indica maior média para o cultivo com micronutrientes extra, no 19° ($208,702 \pm 38,951 \mu\text{g mL}^{-1}$), 20° ($211,665 \pm 27,900 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 21° ($230,285 \pm 13,249 \mu\text{g mL}^{-1}$) dia de cultivo, sendo que os valores encontrados para esses dias não se diferem estatisticamente. Entre os dois cultivos há diferença no 9°- 10°e no 15°-21° dia, onde não há nenhum fator em comum.

Ambos os cultivos apresentaram valores de clorofila *b* maiores ($17,699 \pm 1,266 \text{ mg g}^{-1}$ sem suplementação e $14,389 \pm 2,004 \text{ mg g}^{-1}$ com suplementação) que os relatados por Babadi *et al.* (2020), que cultivaram *Chlorococcum humicola* atingindo $5,90 \pm 0,15 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofila *b* quando extraída com acetona e $3,95 \pm 0,09 \text{ mg g}^{-1}$ quando extraída com éter dimetil no 15° dia de cultivo. Dados em mg g^{-1} de clorofila *b* presentes no Anexo D.

Valores maiores também aos obtidos por Morcelli *et al.* (2021) de $4,73 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ utilizando a *Chlorella sorokiniana* no processo de extração supercrítica com 4,2 bar de pressão e temperatura de $257,7^\circ\text{C}$ e etanol como co-solvente a 7,9% (v/v), e aos obtidos por Sarkar *et al.* (2020) de aproximadamente $7,36 \text{ mg g}^{-1}$, utilizando *Chlorella Thermophila* com agitação de 10.000 rpm em 4°C durante 12 minutos.

FIGURA 19 - Teor de Clorofila *b* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.

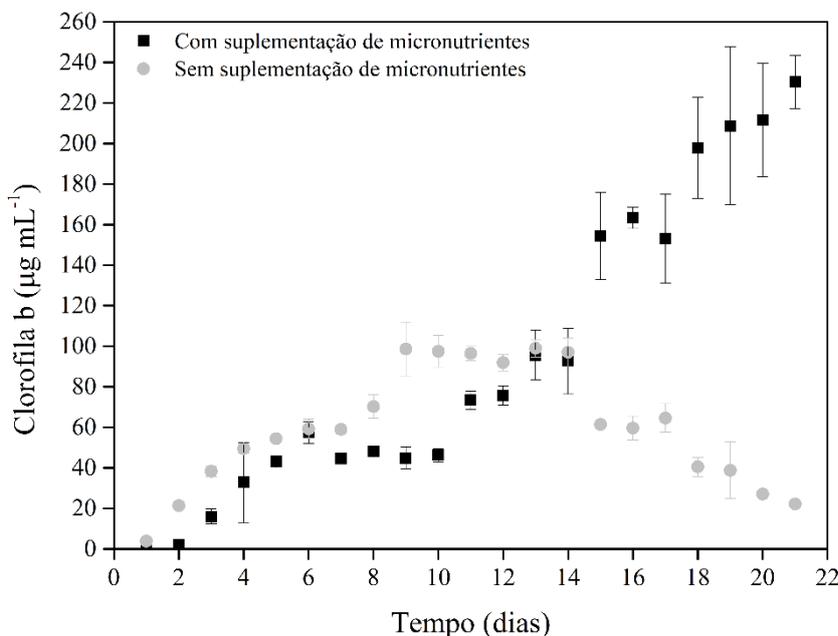
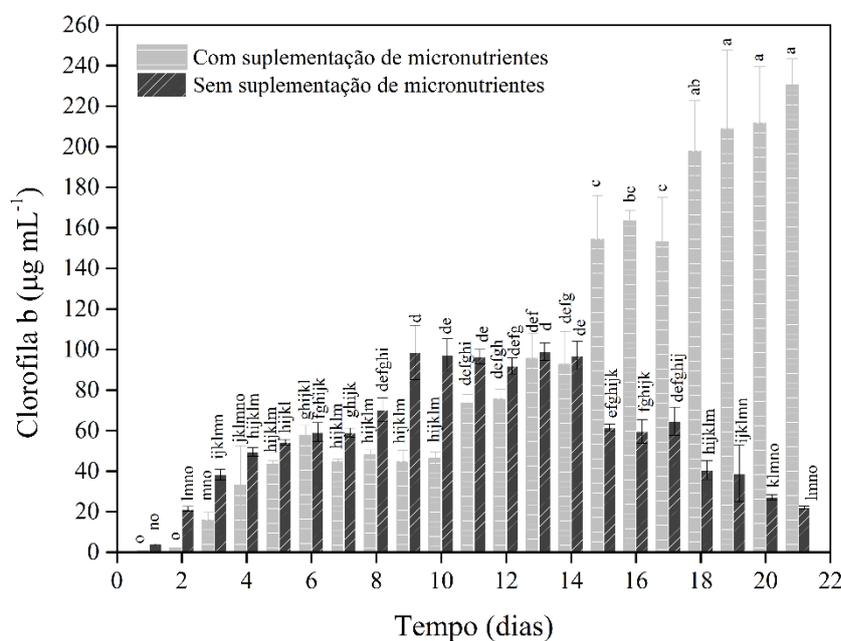


TABELA 13 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta clorofila *b* estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	393811,5	41	9605,2	72,752	0,00
Resíduos	11090,2	84	132,0		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de clorofila *b* ($N = 3$) estimados nos 21 dias de cultivos das *microalgas P. malhamensis* com e sem a adição suplementar de micronutrientes.

FIGURA 20 - Teste de Tukey para a teor de clorofila *b* em um cultivo com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.



5.3.3 Carotenoides

No cultivo com a suplementação de micronutrientes foi alcançada uma média de 3 vezes a quantidade de carotenoides obtido no cultivo sem a suplementação (Figura 21). Foi obtido $34,938 \pm 5,569 \mu\text{g mL}^{-1}$ no 11º dia de cultivo com suplementação e $10,432 \pm 1,340$ no 16º dia no cultivo sem suplementação (Anexo E). Realizou-se a ANOVA para os valores obtidos, e o resultado foi ($p < 0,10$) (Tabela 14), indicando que há diferença estatística em pelo menos um dos valores encontrados. O teste de Tukey (Figura 22) indica similaridade em pelo menos um parâmetro entre o 15º e 18º dia, entre os cultivos com e sem adição extra de micronutrientes.

FIGURA 21 - Teor de carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.

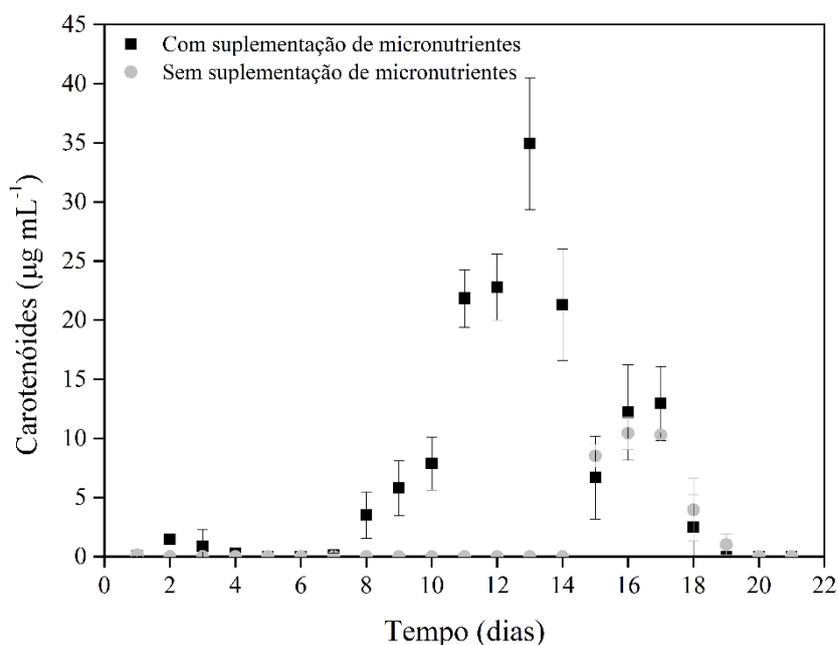


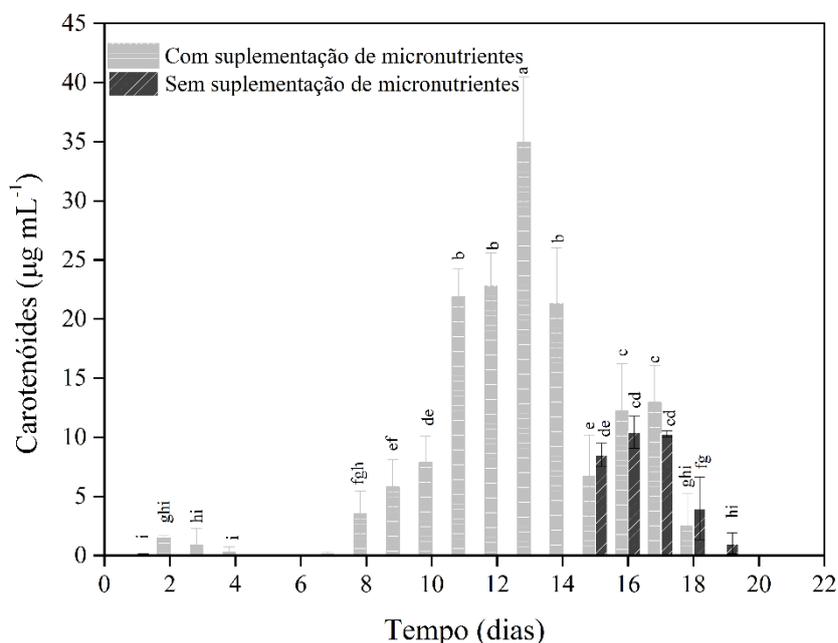
TABELA 14 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta carotenoides estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	7745,029	41	188,903	53,8826	0,00
Resíduos	294,490	84	3,506		

SQ: soma de quadrados; g.l.: grau de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de carotenoides ($N = 3$) estimados nos 21 dias de cultivos das *microalgas P. malhamensis* com e sem a adição suplementar de micronutrientes.

Babadi *et al.* (2020), cultivaram *Chlorococcum humicola* e alcançaram em mg g^{-1} $2,01 \pm 0,16$ usando o a acetona como solvente e $4,14 \pm 0,10$ utilizando éter dimetil. Morcelli *et al.* (2021) obteve o valor de $4,071 \pm 0,130 \text{ mg g}^{-1}$ utilizando a *Chlorella sorokiniana* em uma extração exaustiva. Empregando a *Chlorella Thermophila*, Sarkar *et al.* (2020) obteve aproximadamente 1 mg g^{-1} de carotenoides totais com uma agitação de 10.000 rpm em 4°C durante 6 minutos. González *et al.* (2020) em seus estudos com diversas cepas de microalgas alcançaram entre 1,4 e $4,2 \text{ mg g}^{-1}$ de teor de carotenoides. Valores próximos aos alcançados para *P. malhamensis* de $2,57 \pm 0,06$ e $3,46 \pm 0,55 \text{ mg g}^{-1}$ para os cultivos sem suplementação e com suplementação de micronutrientes respectivamente, utilizando metanol para extração.

FIGURA 22 - Teste de Tukey para teor de carotenoides em um cultivo com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.



5.4 SUPLEMENTAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE LÍPIDIOS

A extração dos lipídios foi feita pelo método de extração sucessiva descrita no capítulo 4.4 utilizando metanol e clorofórmio na proporção 1:1. O conteúdo lipídico da *P. malhamensis* entre o 3° e 21° dia de cultivo alcançou em média 20,10% para o cultivo em meio M-8 que obteve suplementação de micronutrientes e de 16,20% para o cultivo sem a suplementação. O maior valor extraído ocorreu no 16° dia do cultivo com suplementação de micronutrientes, obtendo $24,344 \pm 0,957\%$ (g lipídios brutos g biomassa seca⁻¹) (Figura 23). Sendo esses resultados dentro da faixa de valores alcançados por Do Nascimento *et al.* (2012) em seu trabalho com 21 cepas de microalgas onde apresentaram entre 2 e 35% de lipídios na sua estrutura.

Realizou-se a ANOVA para a variável resposta estuda quantidade de lipídio em ambos os cultivos durante os 21 dias e o resultado aponta diferença estatística em pelo menos um dia de cultivo ($p < 0,10$) (Tabela 15). Assim, as médias estatisticamente diferentes foram determinados para a variável estudada, utilizando Tukey. Conforme os resultados do teste de Tukey (Figura 24) a partir do 12° dia até o 21° dia ocorre diferença estatística entre os valores obtidos dos cultivos no mesmo dia quando comparados.

FIGURA 23 - Rendimento em lipídios ($\text{g}_{\text{lipídios totais}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo, com e sem suplementação de micronutrientes.

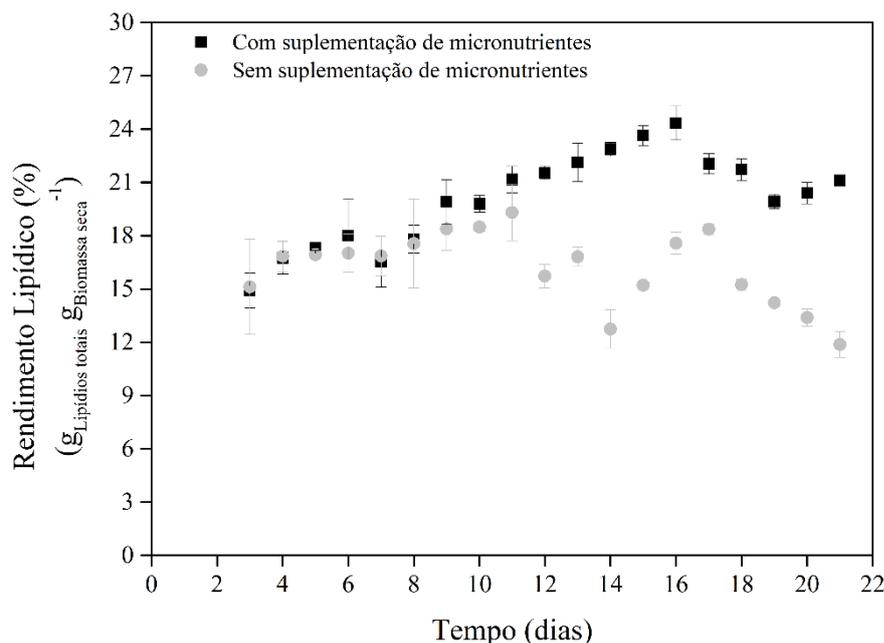


TABELA 15 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta lipídios totais estimada em cultivos de microalgas com e sem suplementação de micronutrientes.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	1027,940	37	27,780	27,1100	0,00
Resíduos	77,880	76	1,020		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de lipídios totais ($N = 3$) estimados nos 21 dias de cultivos das *microalgas P. malhamensis* com e sem a adição suplementar de micronutrientes.

A porcentagem de lipídios, para o cultivo sem suplementação de micronutrientes, variou entre 19,31% e 11,88%, obtendo a maior quantidade no 11º dia durante a fase estacionária e a menor no 21º dia em que já se encontrava na fase de declínio. Entre o 11º e 14º dia verificou-se uma queda na produção de lipídios de mesmo modo que houve uma queda na produção de biomassa, entretanto mesmo a biomassa continuando diminuindo até o final do cultivo, há um aumento na quantidade de lipídios entre o dia 14º e 17º dia, e em seguida volta a diminuir a porcentagem de lipídios presentes nas células. Algo similar ocorre no cultivo com suplementação de micronutrientes, onde no 16º dia inicia uma queda na porcentagem de lipídios até o 19º dia, em seguida há um pequeno aumento até o final do cultivo. Como ambos os experimentos seguiram os mesmos padrões de cultivo até o 8º dia, podemos deduzir que a suplementação de micronutrientes fez com que a quantidade de

lipídios no 11° dia continuasse a aumentar até se esgotar os micronutrientes no 16° dia, já o cultivo sem a suplementação no 11° dia já havia se esgotado, conseqüentemente a uma diminuição no teor de lipídios durante 3 dias em ambos os cultivos. A falta de micronutrientes necessários para o desenvolvimento das células faz com que ocorra o stress no cultivo, ocasionando um acúmulo de lipídios nas microalgas, ocorrendo no cultivo sem suplementação durando 4 dias, após esse tempo o cultivo já está em um processo avançado de lise, ocasionando a diminuição também dos lipídios presentes nas células. Para o cultivo com suplementação, inicia o processo de aumento de lipídios até o final do cultivo, visto que esse cultivo com suplementação encerra no 21° dia, onde acontece o início da lise

A tendência da microalga com estresse osmótico (adição de NaCl) é diminuir a concentração celular enquanto com a limitação de nitrogênio é aumento da concentração celular, ambos os stress apresentaram aumento no número de lipídeos (González *et al.*, 2020). No presente trabalho a introdução de nutrientes como B, Mn, Zn, Mo e Cu, durante o cultivo aumentou o rendimento de biomassa bem como o rendimento de lipídios. Ketchum (1954) explica que traços de Zn, Mn, Cu e Co são requeridos por vários flagelados de algas em quantidades diferentes para cada tipo de espécie, sendo o que para alguns é uma quantidade suficiente para um bom desenvolvimento de um cultivo, para outro pode ser tóxico. Provasoli (1958) relata que *Ochromonas* cultivadas em temperatura acima do normal ocasionam desequilíbrio em seu cultivo e a necessidade desses metais aumentam dramaticamente. Dessa forma, os micronutrientes suplementados no cultivo proporcionaram melhores condições no meio para a microalga se multiplicar e gerar maior quantidade de lipídios, e a sua falta ocasiona uma diminuição na divisão celular .

A taxa de crescimento e a porcentagem de lipídios geralmente são os parâmetros de maior relevância e que são considerados na maioria dos estudos quando o assunto é escolha de uma cepa para a produção em larga escala de biocombustível. Taxas de crescimento menores contribuem para diminuir a produtividade da biomassa, mesmo quando o teor de lipídios é alto, dessa forma, o rendimento de biomassa pode ser considerado um critério adequado para a produção de biodiesel apenas quando associado à produtividade lipídica (Nascimento *et al.*, 2013). Assim sendo, consta na Tabela 16 os dados referentes a produtividade lipídica volumétrica de ambos os cultivos. Para o cultivo com suplementação de micronutrientes, encontra-se no 18° dia o maior valor referente a produtividade volumétrica lipídica de $0,551 \text{ g}_{\text{lipídios bruto}} \text{ L}^{-1}\text{dia}^{-1}$, embora que o maior percentual de lipídios ocorreu no 16° dia ($24,344 \pm 0,957 \text{ g}_{\text{lipídios bruto}} \text{ g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$). Similar

ao ocorrido no cultivo com suplementação, no cultivo sem suplementação no mesmo dia que atingiu a maior produtividade de biomassa também sucedeu-se a maior produtividade lipídica volumétrica, neste caso no 3º dia com 0,264 g_{lipídios} bruto L⁻¹dia⁻¹ de produtividade volumétrica de lipídios, embora seja o 11º dia com a maior quantidade de lipídios presentes na microalga *P. malhamensis*.

FIGURA 24 - Teste de Tukey para o rendimento em lipídios (g_{lipídios} totais g_{biomassa seca}⁻¹) cultivado com e sem suplementação de micronutrientes em função do tempo.

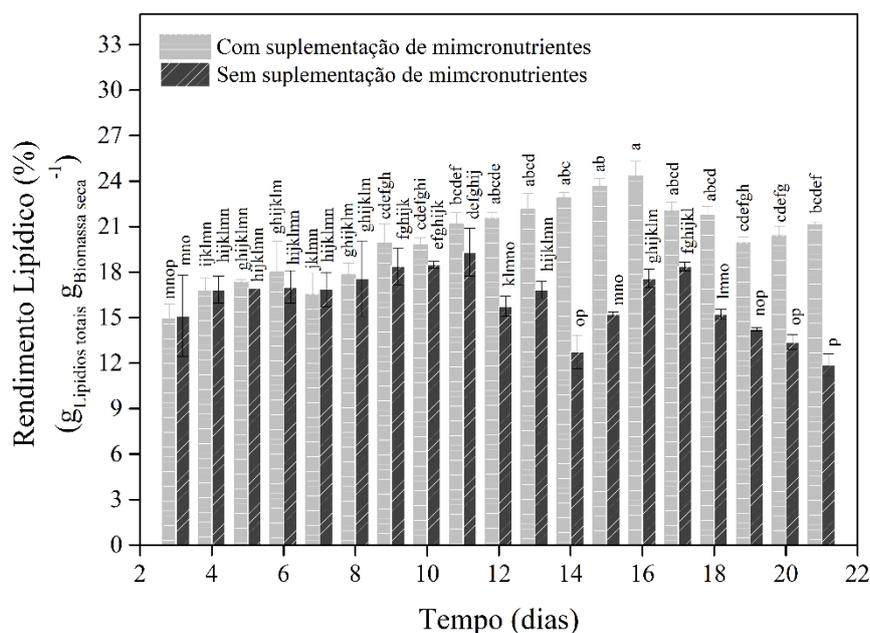


TABELA 16 - Produtividade lipídica volumétrica.

Dia	Com suplementação de micronutrientes		Sem suplementação de micronutrientes	
	Lipídios % (g _{lipídios} bruto g _{biomassa seca} ⁻¹)	Produtividade lipídica volumétrica (g _{lipídios} bruto L ⁻¹ dia ⁻¹)	Lipídios % (g _{lipídios} bruto g _{biomassa seca} ⁻¹)	Produtividade lipídica volumétrica (g _{lipídios} bruto L ⁻¹ dia ⁻¹)
3	14,905±0,986	0,207	15,124±2,681	0,264
4	16,749±0,892	0,390	16,850±0,885	0,212
5	17,331±0,169	0,209	16,935±0,000	0,208
6	17,991±2,056	0,157	17,019±1,085	-0,009
7	16,530±1,410	0,114	16,865±1,125	0,208
8	17,812±0,776	0,101	17,559±2,503	-0,036
9	19,897±1,268	0,103	18,389±1,210	-0,012
10	19,791±0,463	-0,071	18,491±0,237	0,095
11	21,158±0,756	0,127	19,310±1,574	-0,063

12	21,546±0,364	0,171	15,730±0,663	-0,123
13	22,144±1,072	0,190	16,820±0,555	-0,090
14	22,881±0,378	0,055	12,747±1,100	-0,037
15	23,631±0,550	0,094	15,210±0,156	-0,109
16	24,344±0,957	0,161	17,585±0,606	-0,100
17	22,044±0,574	0,234	18,362±0,286	-0,036
18	21,735±0,611	0,551	15,246±0,305	-0,077
19	19,930±0,406	0,102	14,230±0,120	-0,064
20	20,394±0,595	0,408	13,396±0,497	-0,017
21	21,113±0,212	-0,334	11,877±0,723	-0,040

Utilizando os dados de produtividade do cultivo na fase exponencial de 0-3 dias para o cultivo com suplementação de micronutrientes e 0-2 dias para o cultivo sem suplementação extra, entretanto utilizando o dado de porcentagem de lipídio obtido no dia 3 para o cultivo sem suplementação pela falta desse dado no 2º dia, obtemos 0,126 e 0,099 g lipídios bruto L⁻¹dia⁻¹ para o cultivo com e sem suplementação consecutivamente, valores próximos aos encontrados por Nascimento *et al.* (2013) para as microalgas *Botryococcus braunii* de 0,112 g L⁻¹dia⁻¹ e para *Botryococcus terribilis* de 0,098 g L⁻¹dia⁻¹.

5.5 PERFIL DIÁRIO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS BRUTAS

Ao longo do cultivo da microalga *Poterioochromonas malhamensis* o qual recebeu suplementação extra de micronutrientes foi analisado o rendimento proteico da biomassa seca, atingindo em média de 48,69±0,73 g proteína bruta g biomassa seca⁻¹ entre o 3º e o 21º dia de cultivo (Figura 25). Valor similar aos obtidos por Do Nascimento *et al.* (2012) que em seu trabalho estudou 21 cepas de microalgas as quais atingiram o valor de menor e maior quantidade de lipídios presentes nas células de 15,26±3,48 (microalga não identificada) e 59,59 ±4,01 para microalga *Ankistrodesmus sp.* Da mesma forma, González *et al.* (2020) em seus estudos encontrou valores para lipídios dentre 28,99±5,38 (microalga não identificada) e 63,86 ± 0,02 para *Coccomyxa sp.*

Executou-se a ANOVA para o rendimento em proteína bruta durante o cultivo e o resultado indica diferença estatística em pelo menos um dia de cultivo ($p < 0,10$) (Tabela 17). Em seguida, as médias estatisticamente diferentes foram determinados para a variável

estudada, utilizando Tukey. A maior média obtida para rendimento proteico aconteceu no 13° e 16° dia, que segundo o teste de Tukey (Figura 26) não se diferem estatisticamente.

FIGURA 25 - Rendimento em proteínas ($\text{g}_{\text{proteína bruta}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) em relação aos dias de cultivo com suplementação de micronutrientes.

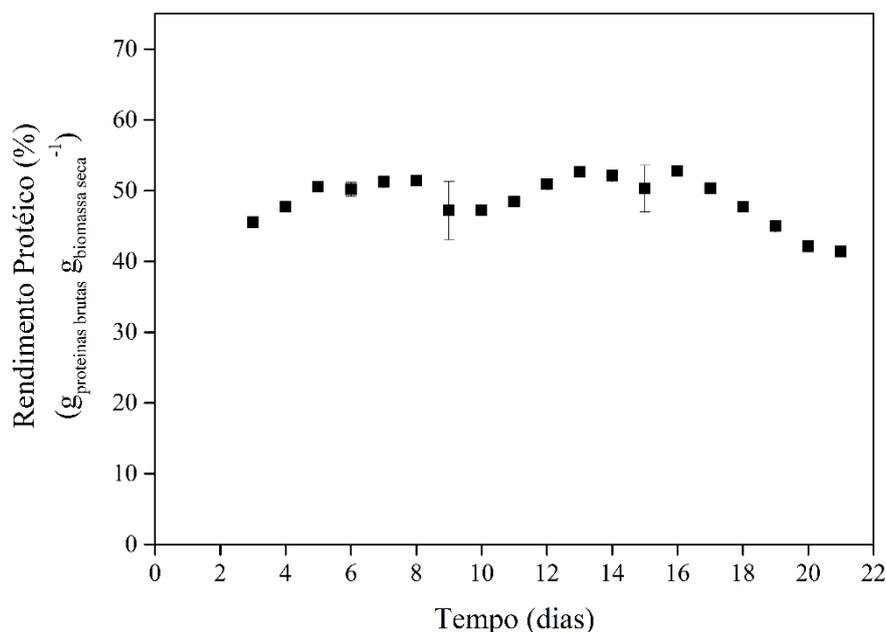


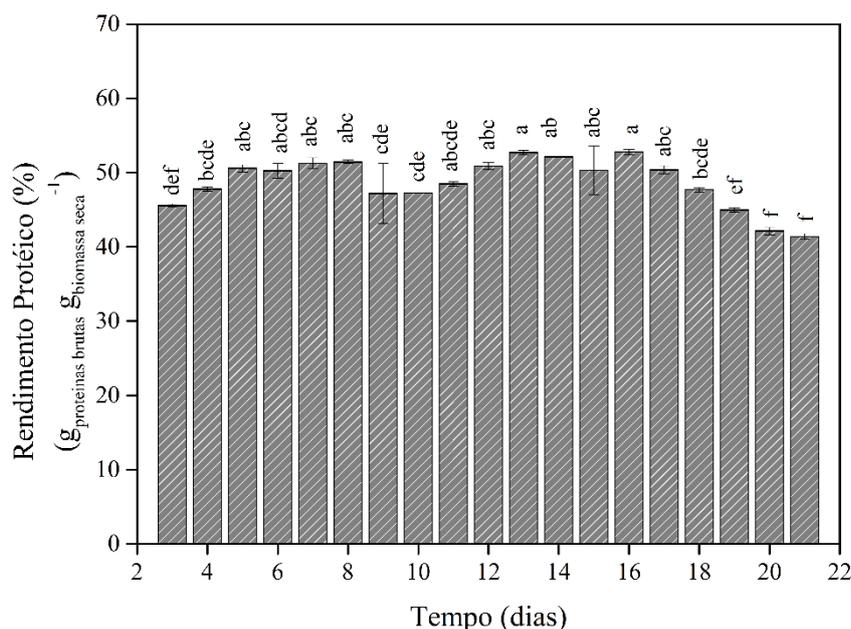
TABELA 17 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único dia de cultivo para a variável resposta proteína bruta estimada em cultivos de microalgas com suplementação de micronutrientes.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	401,96	18	22,33	13,68	0,000
Resíduos	31,01	19	1,63		

SQ: soma de quadrados; g.l.: grau de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de proteína bruta ($N = 2$) estimados nos 21 dias de cultivos das *microalgas P. malhamensis* com adição suplementar de micronutrientes.

Segundo González *et al.* (2020), muitas microalgas têm a capacidade de produzir proteína de até 30 a 60% de seu peso seco, tornando-as boas fontes de proteína para fertilizante orgânico, suplemento nutricional humano ou ração animal. De acordo com Do Nascimento *et al.* (2012) a deficiência de nitrogênio faz com que ocorra uma diminuição na quantidade de proteínas nas células, logo, podemos correlacionar o alto teor de proteínas presente na *P. malhamensis* devido ao meio M-8 com alta carga de nitrogênio.

FIGURA 26 - Teste de Tukey para o rendimento em proteína bruta ($\text{g}_{\text{proteína bruta}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) cultivado com suplementação de micronutrientes em função do tempo.



5. 6 CARACTERIZAÇÃO GERAL

Foi caracterizada a biomassa da microalga *Poteroiochromonas malhamensis* (Tabela 18) no 25° dia de cultivo após o processo de secagem em estufa, para utilização posterior na extração de lipídios e transesterificação *in situ* (tópico 5.7 e 5.8 desse trabalho.)

O teor de cinzas presente na biomassa foi de $8,040 \pm 0,110$ valor na mesma faixa aos encontrado por González *et al.* (2020) no seu trabalho de pesquisa com algumas espécies de microalgas que variou de 4,0 e 15,9%, também próximo ao encontrado por Costard *et al.* (2012) para *Chlorella sp.* de $7,54 \pm 1,21$ % em sua fase estacionaria.

Foi observado teor de umidade de $6,634 \pm 0,482$ % presente na amostra já submetida ao processo de secagem, valor dentre os obtidos por Tang *et al.* (2016), que obteve $3,1 \pm 0,06$ % para *Nannochloropsis* e $7,8 \pm 0,26$ % para *Spirullina*.

Do Nascimento *et al.* (2012) verificaram um teor de carboidratos de $34,00 \pm 3,21$ % ao avaliarem o conteúdo da *Haematococcus pluvialis* com nitrogênio em excesso, valor próximo ao encontrado nesse estudo para carboidratos totais (35,250%).

TABELA 18 - Composição Química no 25° dia de cultivo da microalga *P. malhamensis*

Parâmetros	Teor	Unidade
Cinzas	8,040±0,110	%
Umidade	6,634±0,482	%
Matéria seca	93,366±0,262	%
Proteínas Brutas	35,34±0,219	% - g proteína bruta g ⁻¹ biomassa seca
Lipídios Totais	12,101±0,657	% - g lipídios totais g ⁻¹ biomassa seca
Carboidratos Totais	35,250	% - g carboidratos totais g ⁻¹ biomassa seca
Fibras Brutas	0,451±0,005	% - g fibra bruta g ⁻¹ biomassa seca
Carotenoides	0,0±0,0	mg g ⁻¹
Clorofila <i>a</i>	7,081±0,923	mg g ⁻¹
Clorofila <i>b</i>	11,304±1,234	mg g ⁻¹

Valor identificado para as fibras brutas (0,451±0,005%) pequeno quando comparado com aos valores presentes no trabalho de Matos *et al.* (2016) que alcançou 5,6±0,4 para *Chlorella vulgaris* e 8,5±0,5 para a *Nannochloropsis gaditana*. Uma explicação para um valor inferior em comparação a outras microalgas, é a inexistência de parede celular na *P. malhamensis*. As fibras são oriundas dos polissacarídeos não digeríveis que estão presentes tanto em reservas energéticas quanto na parede celular.

González *et al.* (2020) ao analisar os carboidratos presentes em suas microalgas obteve entre 14,9 e 33,6%. Do Nascimento *et al.* (2012) para microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sorokiniana* e *Pseudokirchneriella sp.*, atingiu teores de carboidratos de 23,2, 22,2 e 22,0%, respectivamente. Valores similares ao encontrado nesse trabalho de 22,381%.

Para a matéria seca foi obtido o valor de 93,366±0,262%, valor condizente aos encontrados por Matos *et al.* (2016) para *Chlorella vulgaris* (93,8±0,3), *Nannochloropsis gaditana* (94,7 ±0,4) e *Nannochloropsis oculata* (95,9±0,1).

Outros parâmetros presentes na Tabela 18 discutidos nos tópicos 5.3, 5.4 e 5.5.

5.7 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Neste tópico será visto o rendimento de lipídios totais e ácidos graxos presentes na *P. malhamensis* utilizando técnicas diferentes de extração, variando os parâmetros como quantidade de solvente, espécie de solvente, temperatura e tipo de agitação.

5.7.1 Extração a frio

Para a extração de lipídios, o método criado por Bligh e Dyer (1959) utiliza como solvente uma mistura de clorofórmio, metanol e água. Ao longo dos anos, esse método tem sido modificado, com o objetivo de aprimorar a extração lipídica.

O método de Folch também utiliza a mistura clorofórmio e metanol, porém a introdução da água só é utilizada para separar as fases da extração e não para ajudar no processo de extração.

Sendo as proporções de clorofórmio:metanol:água, a sigla BD1 é a extração na proporção (2:2:1,8), BD1-ULTRA na proporção (2:2:1,8) com o ultrassom, BD2 na proporção (2:2:1), BD3 e BD3-ULTRA é (5,7:3:1) e (5,7:3:1) com o ultrassom respectivamente, e FOLCH (2:1:0,8).

Nas extrações que não empregaram os solventes clorofórmio e metanol, as siglas são: HR1 para a extração de n-hexano e isopropanol (4,5:3), HR1-MOD designa as extrações que utilizaram apenas o n-hexano (foi utilizado etanol no processo de separação de fases), FAJARDO para extração com etanol apenas e FOLCH-MOD para extração onde foi utilizado diclorometano e metanol (2:1:0,8).

Verificou-se um rendimento em lipídios entre $11,519 \pm 0,901$ e $3,082 \pm 1,121\%$ ($g_{\text{lipídio}} / g_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) e são exibidos na Figura 27, onde todos os dados apresentados são a média \pm desvio padrão de extrações em triplicada. A quantidade de lipídios extraído dependeu da técnica e do solvente utilizado. Executou-se a ANOVA para o rendimento em lipídios totais e o resultado indica diferença estatística em pelo menos um método de extração ($p < 0,10$) (Tabela 19). Em seguida, as médias estatisticamente diferentes foram determinados para a variável estudada, utilizando Tukey (Figura 27).

TABELA 19 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único método de extração sem aquecimento para a variável resposta rendimento em lipídios totais.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	219,513	9	24,390	34,076	0,000
Resíduos	14,315	20	0,716		

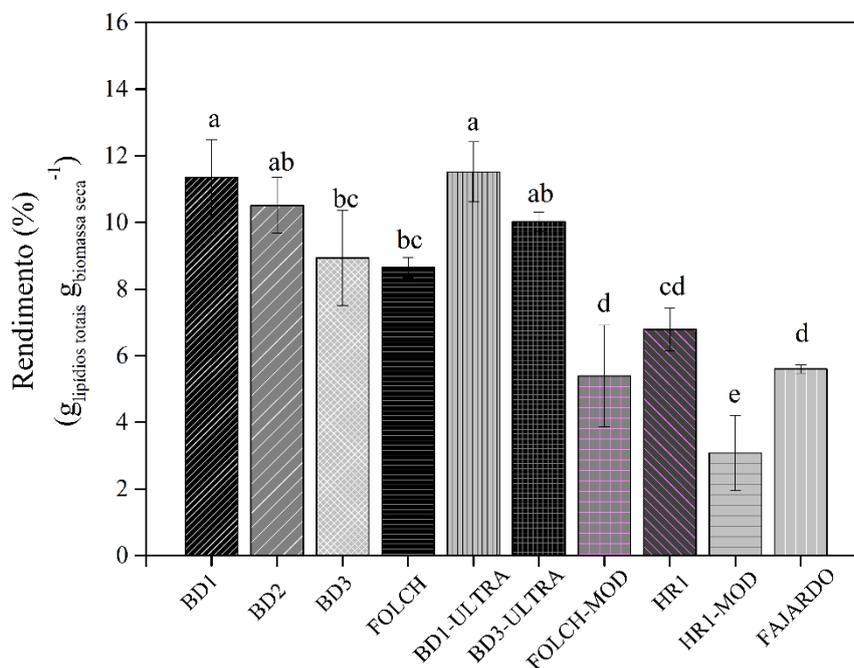
SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de lipídios totais ($N = 3$) estimados em 10 diferentes técnicas de extração sem aquecimento.

A mistura clorofórmio, metanol e água na proporção 2:2:1,8 (BD1) foi a que obteve o maior rendimento dentre as técnicas que não utilizam aumento de temperatura no processo, e pelo teste de Tukey não se difere estatisticamente a nível de 10% de BD2 em relação a letra a. Quando comparada BD1 com as técnicas, BD3 e FOLCH há uma diminuição de aproximadamente 21,27% e 23,76% respectivamente no rendimento. O clorofórmio é um solvente apolar com índice de polaridade 4,1, enquanto o metanol tem índice de polaridade 5,1 e a água 10,2, logo a mistura BD1 pelas suas proporções é mais polar que a BD3, e ambas são mais polares que a mistura de FOLCH, sendo que essa técnica não utiliza água no processo de extração, somente no processo de separação de fases. De Jesus *et al.* (2019) utilizando a *Chlorella pyrenoidosa* também alcançou resultados maiores para a metodologia de Bligh e Dyer ($115,05 \pm 5,32 \text{ mg}_{\text{lipídios}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) em relação a metodologia de Foch ($113,47 \pm 7,58 \text{ mg}_{\text{lipídios}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).

O uso do ultrassom na extração BD1-ULTRA quando comparada com BD1 não houve aumento significativo em nível de 10% estatisticamente para o teste de Tukey. Para a extração BD3-ULTRA em relação a BD3 houve um aumento de 10,86% no rendimento das extrações. Esse aumento no rendimento utilizando o banho ultrassônico está ligado a ruptura celular provocado pelas ondas sonicas que geram microbolhas de cavitação na superfície da célula ocasionando sua desintegração. D'Oca *et al.* (2011) quando comparou a extração de Bligh e Dyer utilizando a agitação magnética e o ultrassom por 20 minutos, obteve um aumento de aproximadamente 10% para 12,5% no rendimento lipídico.

Quando utilizado outros solventes diferentes da mistura clorofórmio e metanol houve uma diminuição acentuada do rendimento lipídico. Ao alterar o clorofórmio e adicionar o diclometano na extração FOLCH-MOD, quando comparado com o FOLCH para o teste de Tukey, os resultados apresentam diferenças estatística significativa a nível de 10%. Havendo uma diminuição no rendimento da extração próximo de 37,68%. Essa diminuição ocorre com a diminuição na polaridade da mistura do sistema, sendo o diclometano menos polar que o clorofórmio, assim explicando também o menor rendimento obtido ser da técnica de extração feita apenas utilizando o hexano (HR1-MOD). Jesus *et al.* (2019) ao utilizar a microalga *Chlorella pyrenoidosa* com 65,71% de umidade, e comparar o processo FOLCH, HR1 e HR1-MOD atingiu $113,47 \pm 7,58$, $108,66 \pm 4,78$ e $9,62 \pm 0,98$ ($\text{mg}_{\text{lipídios}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) respectivamente. Evidenciando também um menor desempenho na extração apenas com hexano.

FIGURA 27- Rendimentos de lipídeos extraídos (%) utilizando técnicas diferentes de extração, onde não há o uso de temperatura maiores que 25°C e teste de Tukey.



Halim *et al.* (2012) explica que a dificuldade em apenas um solvente apolar extrair os lipídios das células está ligado aos lipídios presentes no citoplasma, esses o qual estão fortemente ligados por pontes de hidrogênio a proteínas na membrana celular e as interações de Van der Waals formadas entre o solvente orgânico apolar e os lipídios neutros no complexo são inadequadas para interromper essas associações lipídio-proteína, por outro lado, um solvente orgânico polar é capaz de interromper essas associações.

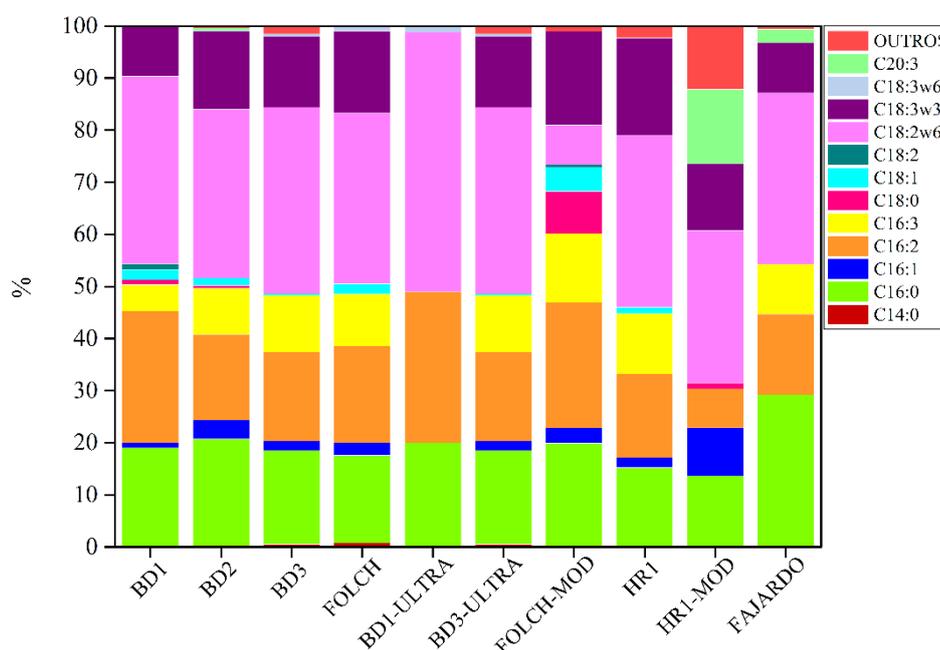
Lee *et al.* (1998) em seu trabalho com a microalga *Botryococcus braunii*, quando comparado a extração com clorofórmio e metanol na proporção (2:1) com a extração de hexano e isopropanol (3:2), alcançou também um maior rendimento para a mistura com clorofórmio e metanol de 28,6% já para a mistura com hexano e isopropanol houve uma diminuição de aproximadamente 30% no rendimento.

Os perfis de ácidos graxos obtidos nos respectivos processos de extração são apresentados na Figura 28. Os resultados experimentais indicaram que o óleo extraído era composto principalmente de ácido palmítico (C16:0), ácido palmitolênico (C16:2), ácido hircônico (C16:3), ácido linoleico (C18:2 ω 6c) e ácido α -linolênico (C18:3 ω 3). Esses cinco ácidos graxos representam mais de 90% da composição total de ácidos graxos do óleo extraído, exceto para a extração HR1-MOD, onde ocorre um elevado índice de C16:1 e C20:3. Outros ácidos graxos, como os ácidos mirístico (C14:0), ácido esteárico (C18:0) e

ácido γ -linolenico (C18:3 ω 6). também foram observados com uma área de pico menos predominante.

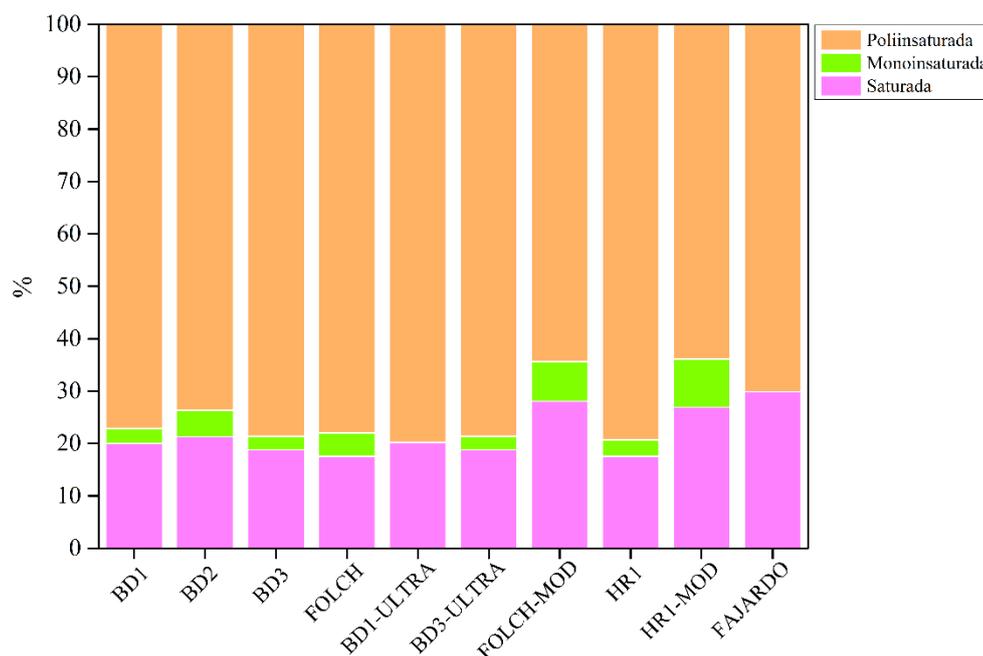
Os ácidos graxos da microalga *P. malhamensis* analisados por cromatografia gasosa e extraídos com solventes apolares e próticos polares (álcoois) relatou a presença de ácidos graxos de tipo insaturado como predominantes nos lipídios extraídos (Figura 29). O ácido linoleico (C18:2 ω 6c) foi predominante em todas as extrações com exceção da extração FOLCH-MOD, onde ocorreu uma maior incidência do ácido palmitolênico (C16:2).

FIGURA 28 - Perfil de ácidos graxos da *Poterioochromonas malhamensis* obtido por diferentes métodos de extração a 25°C.



Os ácidos graxos de natureza poliinsaturada extraídos pela técnica BD1-ULTRA mostrou maior porcentagem em composição (79,83%) em contrapartida a técnica HR1-MOD que utiliza apenas hexano alcançou apenas 63,67%. Para os ácidos graxos saturados, a utilização de apenas etanol (FAJARDO) na extração rendeu o maior valor, sendo alcançado 29,87%. Para a indústria dos biocombustíveis quantidades apreciáveis de ácidos graxo saturados são desejadas. O ácido palmítico (C16:0) proporciona ao óleo resistência à degradação oxidativa em condições de altas temperaturas e, assim, aumenta seu tempo de armazenamento. De maneira oposta, não são desejados para indústria de alimentos funcionais, uma vez que os ácidos graxos saturados são relacionados com aumento dos níveis de LDL (low density lipoprotein) no organismo, aumentando os riscos de doenças coronarianas (BERMUDEZ-SIERRA, 2018).

FIGURA 29 - Composição dos ácidos graxos da *Poteriochromonas malhamensis* a 25°C utilizando técnicas diferentes de extrações.



Na indústria de biocombustível a utilização de óleos com altas quantidades de ácido oleico apresentam boas propriedades de equilíbrio. Essas propriedades incluem qualidade de ignição, combustão em calor, redução do ponto de obstrução de filtro frio em regiões frias, estabilidade oxidativa, viscosidade, lubrificação e número de cetano (BERMUDEZ-SIERRA, 2018), sendo o maior valor obtido pela extração de FOLCH-MOD com 4,66% na composição e não apresentando valor significativo nas extrações com etanol (FAJARDO) e com a mistura hexano e isopropílico (HR1).

5.7.2 Extração a quente

A extração com elevação de temperatura ocorreu utilizando dois métodos distintos, a extração com o soxhlet e a extração sucessiva. Para ambas foi utilizado os solventes hexano, etanol, diclorometano, éter etílico e a mistura (1:1) de clorofórmio e metanol. Executou-se a ANOVA para os dados obtidos e os resultados indicam diferença estatística em pelo menos um método de extração com determinado solvente ($p < 0,10$) (Tabela 20). Assim, as médias estatisticamente diferentes foram determinados para a variável estudada, utilizando Tukey.

TABELA 20 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único método de extração com elevação de temperatura para a variável resposta rendimento em lipídios totais

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	219,513	9	24,390	34,076	0,000
Resíduos	14,315	20	0,716		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de lipídios totais (N = 3) estimados em 10 diferentes técnicas de extração com elevação de temperatura.

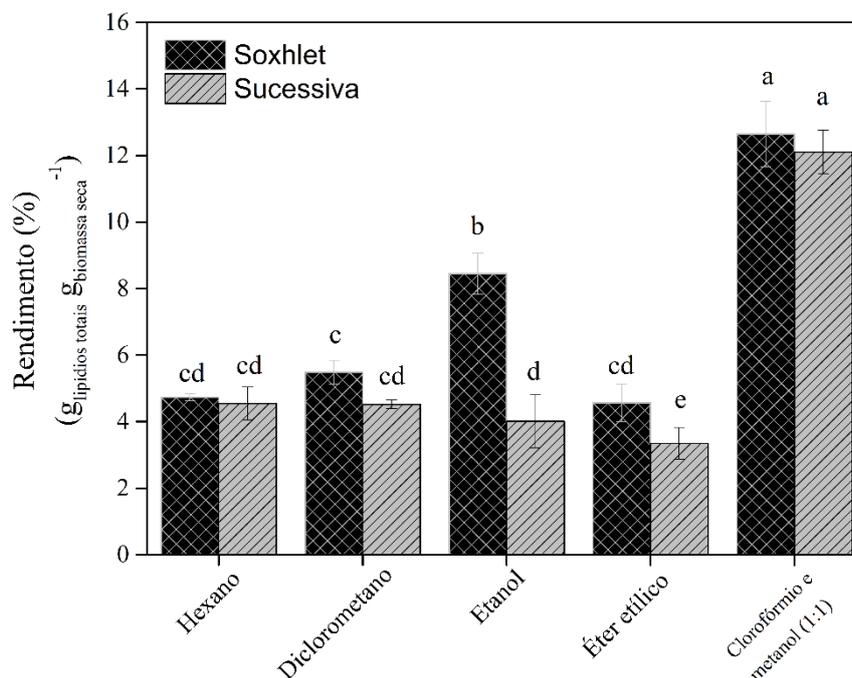
De acordo com os resultados do teste de Tukey, o maior rendimento obtido sucedeu-se com o método de soxhlet e com o método sucessivo utilizando como solvente clorofórmio e metanol na mesma proporção, segundo Tukey (Figura 30) os rendimentos obtidos em ambas não se diferem estatisticamente a nível de 10%, sendo o valor obtido para a extração com o equipamento soxhlet de $12,642 \pm 0,980\%$ ($\text{g}_{\text{lipídio}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) e para extração sucessiva $12,101 \pm 0,658\%$ ($\text{g}_{\text{lipídio}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$).

Para a extração utilizando etanol (soxhlet e sucessiva) houve diferença estatística a nível de 10%, obtendo o rendimento utilizando o soxhlet de $8,445 \pm 0,619\%$ ($\text{g}_{\text{lipídio}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) e para a extração sucessiva o rendimento foi de $4,017 \pm 0,805\%$ ($\text{g}_{\text{lipídio}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$). Sendo essa diferença a mais significativa quando comparada as técnicas de extração para cada solvente. Essa diferença pode estar associada com a temperatura utilizada em cada técnica, sendo na extração sucessiva a temperatura de 60°C e na extração via soxhlet, foi utilizada a temperatura de ebulição do solvente, nesse caso aproximadamente 79°C .

O método soxhlet em todas as extrações obteve maior ou igual rendimento lipídico quando comparado com o método sucessivo, uma explicação para o ocorrido pode estar relacionada com o tempo de duração de cada extração. 6,5 e 3 horas foram os tempos das extrações via soxhlet e sucessiva respectivamente.

Jesus *et al.* (2019) na extração via soxhlet utilizando apenas hexano, atingiu $44,07 \pm 2,54$ ($\text{g}_{\text{lipídio}} \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$) com a *Chlorella pyrenoidosa* (65,71% de umidade), quando comparado essa extração com a extração a temperatura ambiente com apenas hexano houve uma diminuição de aproximadamente 78% de rendimento, valor acima do encontrado nesse trabalho de 34% de diminuição no rendimento.

FIGURA 30 - Rendimentos de lipídeos (%) extraídos via soxhlet e extração sucessiva com os solventes hexano, diclorometano, etanol, éter etílico e a mistura clorofórmio e metanol. Teste de Tukey representado pelas letras.



McNichol *et al.* 2012 ao comparar as extrações via soxhlet utilizando hexano e etanol também verificou-se um rendimento maior para o solvente etanol em relação ao hexano. Para o etanol o rendimento foi de aproximadamente 25% (*B. braunii*) e 23% (*P. tricornutum*) e para o hexano foi atingido o rendimento de 16% (*B. braunii*) e 4% (*P. tricornutum*).

Os perfis de ácidos graxos obtidos dos respectivos processos de extração são apresentados na Figura 31. Consistindo os solventes com a letra A (ex: Hexano - A) obtidos no modo soxhlet e com a letra B no modo extração sucessiva.

Os resultados mostram a composição do óleo em sua maioria é de (C16:0), (C16:2), (C16:3), (C18:2 ω 6c) e (C18:3 ω 3), sendo a mesma das extrações a frio. Na extração via soxhlet esses ácidos graxos representam no mínimo 84% da composição do óleo, e na extração sucessiva esse número é menor, correspondendo no mínimo de 65%.

Em ambas as extrações com Diclorometano ocorreu uma alta concentração de C20:3. E na extração sucessiva com etanol foi obtido 16,8% de C:16:1.

Segundo Jesus *et al.* (2019) para a produção de biodiesel a composição do óleo deve conter uma mistura de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e di-insaturados, a média das extrações a quente para essa mistura foi de 67,46%, (Figura 32) abaixo do valor

encontrado para extrações a frio que foram de 75,29%. Essa diminuição pode estar relacionada com o aumento de ácidos graxos poliinsaturados com o aumento da temperatura.

FIGURA 31 - Perfil de ácidos graxos da *Poterioochromonas malhamensis* obtido pelos métodos de extração sucessiva (B) e via soxhlet (A).

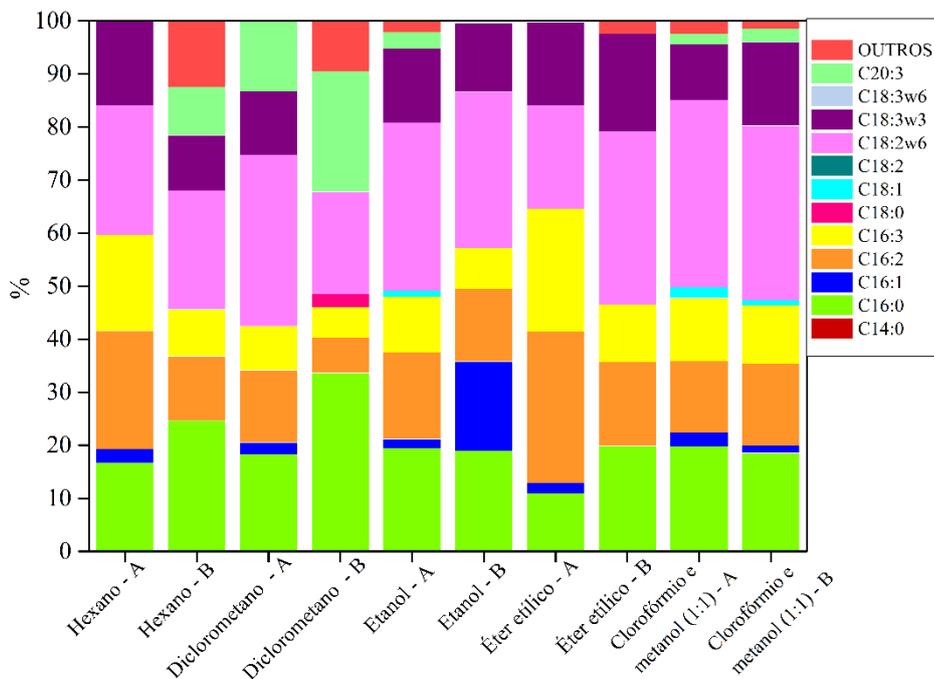
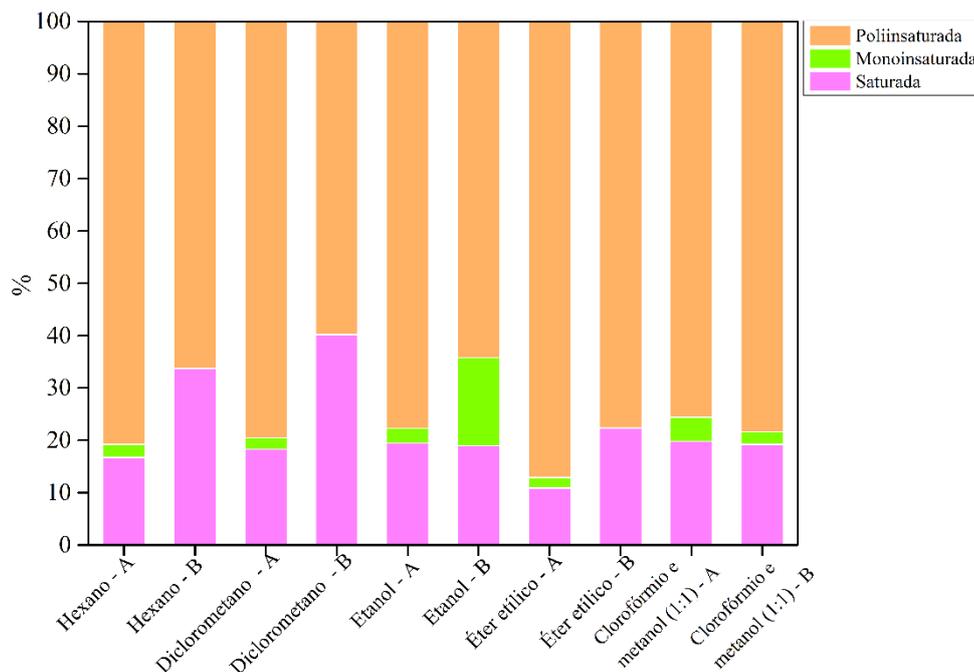


FIGURA 32 - Composição dos ácidos graxos da *Poterioochromonas malhamensis* utilizando a extração sucessiva e a extração com o soxhlet em diferentes solventes.



5.7.3 Extração supercrítica

A extração de lipídios utilizando CO₂ no estado supercrítico, com temperatura de 50°C e pressão de 25MPa, foi realizado durante o tempo de 120 minutos com e sem a adição de etanol como cossolvente (Figura 33). Para a extração utilizando apenas CO₂ o rendimento máximo obtido foi de 0,412 g_{lipídios} g_{biomassa seca}⁻¹, valor aproximadamente 224 e 287% menor que o obtido utilizando 10 e 5% de cossolvente respectivamente.

O aumento no valor do rendimento lipídico quando introduzido um solvente polar, indica uma fração maior de lipídios polares presentes nas células da microalga. Tang *et al.* (2011), utilizando temperatura de 40°C e pressão de 35Mpa em 240 minutos para a *Schizochytrium limacinum*, obteve um aumento de 14 para 35% g_{lipídios} g_{biomassa seca}⁻¹ para um teor (m/m) de 0 a 100% de etanol no processo. Valor superior ao encontrado neste trabalho, porém o aumento no rendimento lipídico só ocorreu a partir de 30% (m/m) no teor de cossolvente.

Na Figura 34, foi avaliado para um teor de 5% de etanol como cossolvente, diferentes temperaturas e pressões. Obtendo uma clara distinção no rendimento em lipídios com início no tempo de 20 minutos de extração. Para 40°C e 20Mpa foi obtido o menor resultado em rendimento de 1,308% g_{lipídios} g_{biomassa seca}⁻¹ atingido ao final de 150 minutos. Todavia, para 40°C e 30MPa houve um aumento em aprox. 76% alcançando 2,309% g_{lipídios} g_{biomassa seca}⁻¹. O resultado aponta que quando há variação de temperatura, o rendimento dependerá da pressão para estabelecer se a mudança será crescente ou decrescente. Para pressão de 20MPa, o aumento da temperatura de 40°C para 60°C gerou um aumento de 35% no rendimento. Contudo, para a pressão de 30MPa, o aumento da temperatura de 40°C para 60°C houve uma diminuição de 16% no rendimento lipídico. Os resultados obtidos condizem com os resultados obtidos por Tang *et al.* (2011), que também obteve, em uma temperatura constante de 40°C, um aumento de aprox. de 14 para 25% g_{lipídios} g_{biomassa seca}⁻¹ para a pressão de 20MPa e 30MPa respectivamente. Para a pressão constante de 35MPa alcançou também uma diminuição no rendimento quando houve variação de temperatura (40-60°C).

Não foi possível executar ANOVA e teste de Tukey para a extração supercrítica, pois as reações foram feitas sem réplicas.

FIGURA 33 - Rendimento em lipídios da extração supercrítica para temperatura de 50°C e pressão de 25MPa.

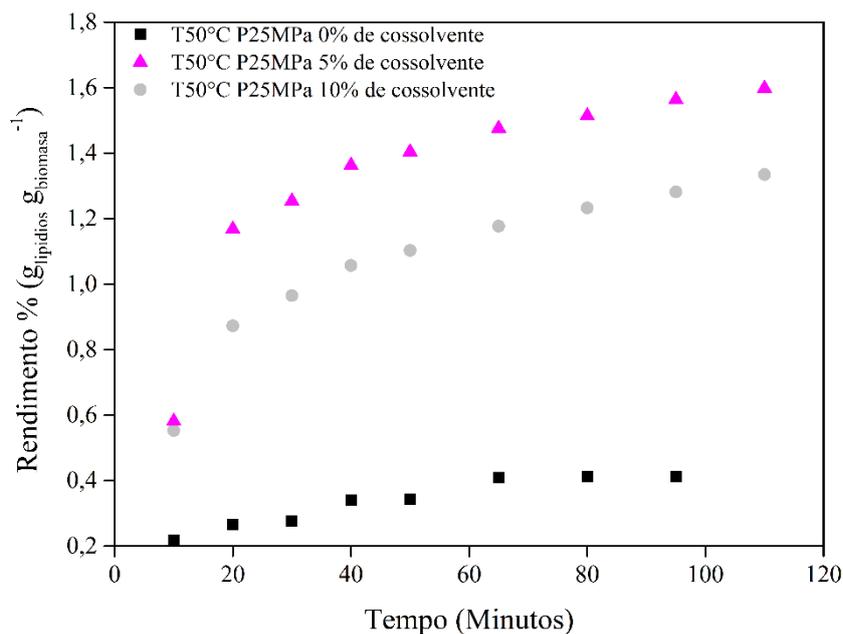
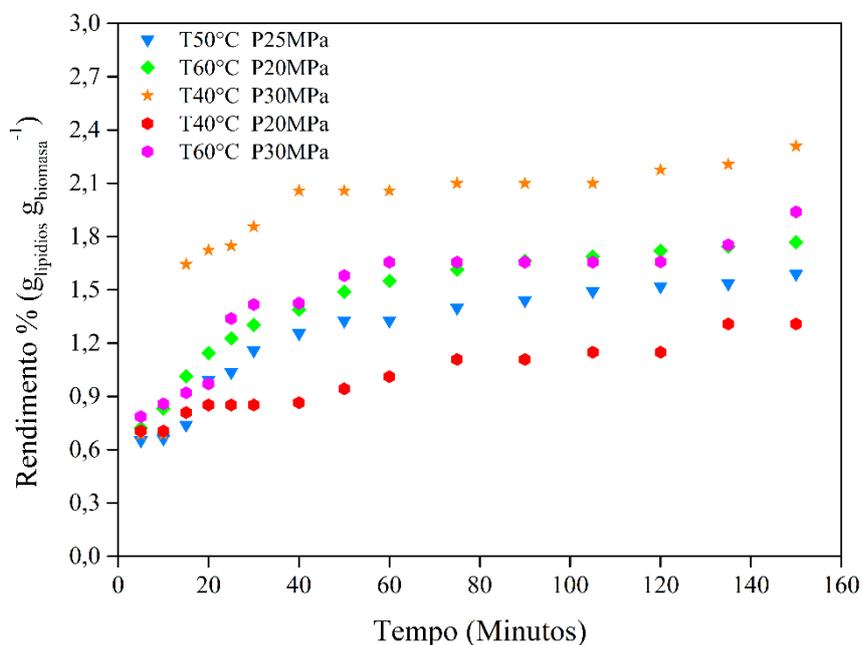


FIGURA 34 - Rendimento lipídico na extração supercrítica variando a pressão e a temperatura do sistema, com a utilização de 5% de etanol como cossolvente.



As frações de ácidos graxos são apresentadas na Figura 35. Ocorrendo em todas as extrações supercríticas uma maior quantidade de C:16 seguida por C:18:2w6 e C:18. Os valores entre as extrações supercríticas com determinadas temperaturas e pressões não provocaram uma grande alteração no perfil de ácidos graxos, entretanto quando

comparadas com as frações obtidas nas Figuras 28 e 31 houve uma inversão de maior ácido graxo obtido, sendo tanto para a extração a frio (Tópico 5.7.1) como para a extração a quente (Tópico 5.7.2). Nessas duas extrações os maiores ácidos graxos foram C:18:2w6; C:16 e C:16:2. Essa técnica proporcionou um grande aumento na proporção de C:18 e uma grande diminuição na proporção de C16:2, sendo esses resultados corroborando com a Figura 36, onde ocorreu um aumento de ácidos saturados (em média 21,97 e 21,89% para extração a frio e a quente respectivamente, para 63,71% para extração supercrítica) e uma diminuição de ácidos poliinsaturados de 74,68 (média da extração a frio) e 74,36% (média da extração a quente) para 26,19% (Figuras 29 e 32).

FIGURA 35- Perfil de ácidos graxos para extrações supercríticas com CO₂ no tempo de 150 minutos com adição de 5% de etanol como co-solvente.

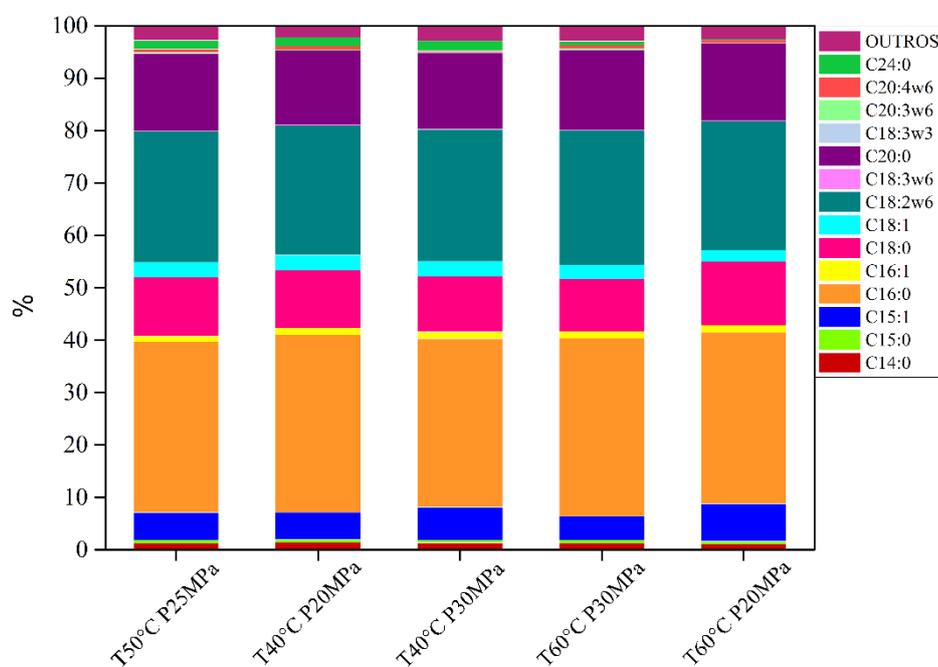
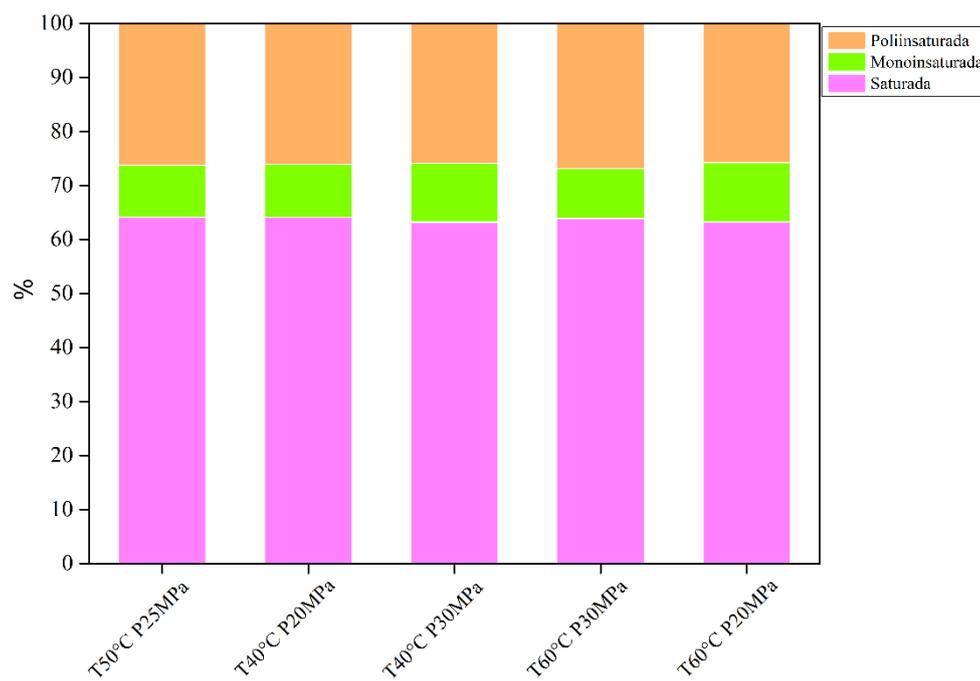


FIGURA 36 - Composição dos ácidos graxos da *Poterioochromonas malhamensis* utilizando a extração supercrítica com CO₂ e 5% de etanol como cossolvente no tempo de 150 minutos.



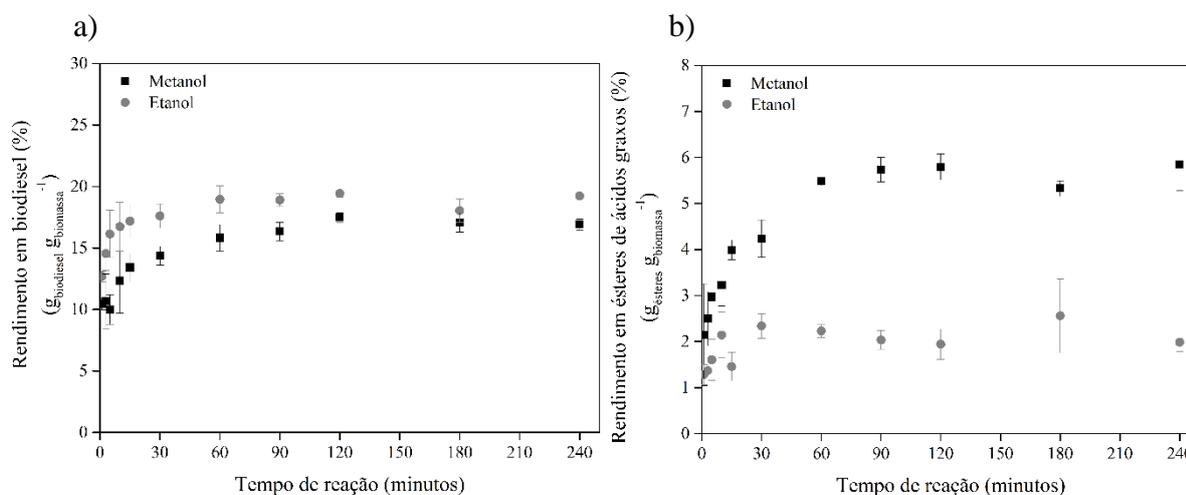
5.8 TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Neste tópico será visto o rendimento em biodiesel e em de ésteres de ácidos graxos por meio da transesterificação *in situ* (direta), alterando a proporção de solvente, de catalisador e a temperatura da reação. Será discutido também a influência do teor de água na biomassa, tipo de solvente usado na reação (etanol e metanol) e teor do cossolvente clorofórmio.

5.8.1 Efeito do tipo de álcool e tempo na transesterificação *in situ*

Ao analisar o efeito do álcool metanol e etanol na transesterificação direta foi obtido um maior rendimento para todos os tempos do etanol em relação ao metanol, quando avaliado a quantidade de biodiesel pela biomassa seca (Figura 37-a). Realizou-se a ANOVA para os dados obtidos e os resultados indicam diferença estatística em pelo menos um valor de rendimento em biodiesel ($p < 0,10$) (Tabela 21). O maior valor alcançado foi de $19,433 \pm 0,306\%$ ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) no tempo de 120 minutos, porém esse valor não se difere estatisticamente em relação a nível de 10% aos valores obtidos a partir do tempo de 5 minutos de reação com etanol para o teste de Tukey (Tabela 22).

FIGURA 37 - Reação de transesterificação *in situ* variando o solvente (metanol e etanol) usado na proporção em volume de 10:1:1 (solvente:catalisador:cossolvente), em 65°C; a) Rendimento em biodiesel; b) Rendimento os ésteres de ácidos graxos pela biomassa seca.



O maior rendimento em biodiesel utilizando o álcool metanol foi também no tempo de 120 minutos, no valor de $17,481 \pm 0,378\%$ ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$), sendo que esse valor também não se difere a nível de 10% para Tukey do maior rendimento atingido para o etanol.

TABELA 21 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único para transesterificação *in situ* utilizando o metanol e o etanol, sendo a variável resposta rendimento em biodiesel % ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	362,01	21	17,24	11,478	0,000000
Resíduos	33,04	22	1,50		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de rendimento em biodiesel (N = 2) estimados em diferentes transesterificações *in situ* com etanol e metanol.

TABELA 22 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em Biodiesel % ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação *in situ* para metanol e etanol, nas condições: 65°C, na proporção em volume de 10:1:1 (etanol ou metanol:HCl:clorofórmio).

Tempo (minutos)	Etanol	Metanol
1	$12,683 \pm 0,421^{efg}$	$10,441 \pm 0,445^g$
3	$14,543 \pm 1,355^{bcdefg}$	$10,658 \pm 2,217^g$
5	$16,141 \pm 1,921^{abcdef}$	$10,002 \pm 1,205^g$
10	$16,729 \pm 1,990^{abcdef}$	$12,349 \pm 2,642^{fg}$
15	$17,183 \pm 1,351^{abcde}$	$13,413 \pm 1,137^{defg}$
30	$17,607 \pm 0,984^{abcd}$	$14,365 \pm 0,769^{cdefg}$
60	$18,962 \pm 1,103^{ab}$	$15,826 \pm 1,072^{abcdef}$
90	$18,909 \pm 0,504^{abc}$	$16,348 \pm 0,740^{abcdef}$
120	$19,433 \pm 0,306^a$	$17,481 \pm 0,378^{abcd}$
180	$18,045 \pm 0,964^{abc}$	$17,055 \pm 0,759^{abcde}$
240	$19,228 \pm 0,098^a$	$16,918 \pm 0,456^{abcde}$

Analisando o rendimento em ésteres de ácidos graxos metílicos e etílicos por biomassa seca (Figura 37-b), nota-se um maior rendimento para o metanol em todos os tempos de reação. Ao realizar a ANOVA para os rendimentos em ésteres, os resultados indicam diferença estatística em pelo menos um valor de rendimento ($p < 0,10$) (Tabela 23). O maior rendimento em ésteres obtido foi no tempo de 240 minutos no valor de $5,839 \pm 0,554\%$ ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$), contudo esse valor não se difere estatisticamente a nível

de 10% pelo teste de Tukey (Tabela 24), aos tempos de 60, 90, 120, 180 minutos para o solvente metanol. O álcool etílico apesar de possuir o mesmo rendimento em biodiesel que o metanol, possui um menor rendimento para ésteres de ácidos graxos, cerca de 60%. Esse menor rendimento em ésteres graxos pode ser explicado devido uma maior reatividade dos radicais metóxido em relação aos radicais etóxido, posto que o tamanho da cadeia carbônica é maior para o etanol e a nucleofilicidade do ânion alcóxido diminui, ocasionando a uma diminuição da reatividade (BAUMGARTNER *et al.* 2013).

TABELA 23 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único para transesterificação *in situ* utilizando o metanol e o etanol, sendo a variável resposta rendimento em ésteres de ácidos graxos % ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	106,5121	21	5,0720	27,945	0,000000
Resíduos	3,9929	22	0,1815		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de rendimento de ésteres (N = 2) estimados em diferentes transesterificações *in situ* com etanol e metanol.

Baumgartner *et al.* (2013) verificaram a síntese de ésteres da biomassa de *Spirulina platenses* em 120 minutos de reação para 60°C nas proporções 10:1:1 (metanol:HCl:Clorofórmio) e obtiveram um rendimento aproximadamente 42 $\text{mg}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (ou 4,2% $\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$), valores próximos aos encontrados neste trabalho.

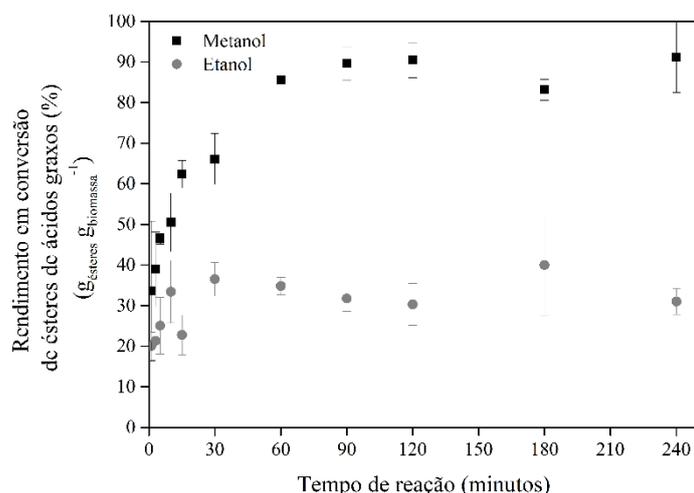
TABELA 24 -Teste de Tukey para variável resposta rendimento em ésteres de ácidos graxos % ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação *in situ* para metanol e etanol, nas condições: 65°C, na proporção em vol. 10:1:1 (etanol ou metanol:HCl:Clorofórmio).

Tempo (minutos)	Etanol	Metanol
1	1,282±0,216 ^h	2,149±1,104 ^{fgh}
3	1,367±0,004 ^h	2,496±0,588 ^{efgh}
5	1,604±0,446 ^{gh}	2,972±0,084 ^{defg}
10	2,142±0,493 ^{fgh}	3,233±0,460 ^{def}
15	1,458±0,310 ^{gh}	3,994±0,215 ^{cde}
30	2,338±0,267 ^{fgh}	4,236±0,404 ^{bcd}
60	2,230±0,138 ^{fgh}	5,481±0,002 ^{abc}
90	2,033±0,205 ^{fgh}	5,737±0,266 ^{ab}
120	1,941±0,327 ^{fgh}	5,796±0,276 ^{ab}

180	$2,561 \pm 0,803^{efgh}$	$5,327 \pm 0,167^{abc}$
240	$1,987 \pm 0,205^{fgh}$	$5,839 \pm 0,554^a$

A Figura 38 expõem os percentuais obtidos na conversão de ácidos graxos. Sendo o rendimento de conversão obtido dividindo o rendimento de ésteres de ácidos graxos da transesterificação *in situ* pelo rendimento em ésteres do método de extração sucessiva. Alcançando a maior conversão para o álcool metílico no tempo de 240 minutos com uma conversão de $91,156 \pm 8,655\%$. Valor próximo ao obtido por Kim *et al.* (2015) de 91,57%, utilizando a microalga *N. gaditana* com 0,1 mL de HCl, 0,5 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 68,4% de umidade por 120 minutos a 95°C.

FIGURA 38 - Rendimento em conversão de ésteres de ácidos graxos na transesterificação *in situ* usado na proporção em volume de 10:1:1 (solvente:catalisador:cossolvente), em 65°C.



Apesar da não diferença entre etanol e metanol nos resultados do biodiesel por biomassa seca, a diferença no rendimento de ésteres de ácidos graxos e conversão da reação devem ser consideradas, logo as próximas reações realizadas serão todas utilizando o metanol, na tentativa de um melhor rendimento de ésteres. Na questão tempo de reação, do mesmo modo que não houve diferença entre os tempos finais da reação para os rendimentos em biodiesel por biomassa, na questão dos ácidos graxos o melhor rendimento foi no tempo de 240 min, sendo fixado para as próximas reações.

5.8.2 Efeito da umidade da biomassa transesterificação *in situ*

A avaliação no teor de água presente na biomassa durante a reação de transesterificação é de suma importância visto que um dos maiores custos na transesterificação direta ou indireta de biodiesel é a secagem da biomassa. Entretanto, a partir dos resultados obtidos (Figura 39-a), observou-se que o rendimento do biodiesel diminuiu enquanto o teor de água aumentou. O rendimento em biodiesel por biomassa com 6,6% de água foi de $16,918 \pm 0,456\%$ valor aproximadamente 17% maior do que com a biomassa com 25% de água.

Porém diferente dos resultados de Cao *et al.* (2013), que o rendimento em biodiesel, utilizando a *Chlorella pyrenoidosa*, diminuiu gradualmente de 90 para 10%, o valor de rendimento em 25%, 50% e 75% não se diferem a nível de 10% estatisticamente para o teste de Tukey (Tabela 25). Essa diferença pode estar associada com a temperatura da reação, onde Cao *et al.* (2013) também estudaram a influência da temperatura juntamente com o teor de água na transesterificação *in situ*, e como resultados eles perceberam que quanto maior a temperatura do sistema, menor será a influência da água na reação. Para temperaturas acima de 150°C o aumento do teor de água ajudou a aumentar o rendimento da reação. Já para temperatura intermediária de 120°C , notaram que a partir de determinada porcentagem no teor de água inicia a influência na reação, que no caso de Cao e colaboradores foi de 50%.

FIGURA 39 - Reação de transesterificação *in situ* alterando teor de água na biomassa. Proporção utilizada 10:1:1 (Metanol:HCl:Clorofórmio), em 65°C a) Rendimento em biodiesel; b) Rendimento os ésteres de ácidos graxos.

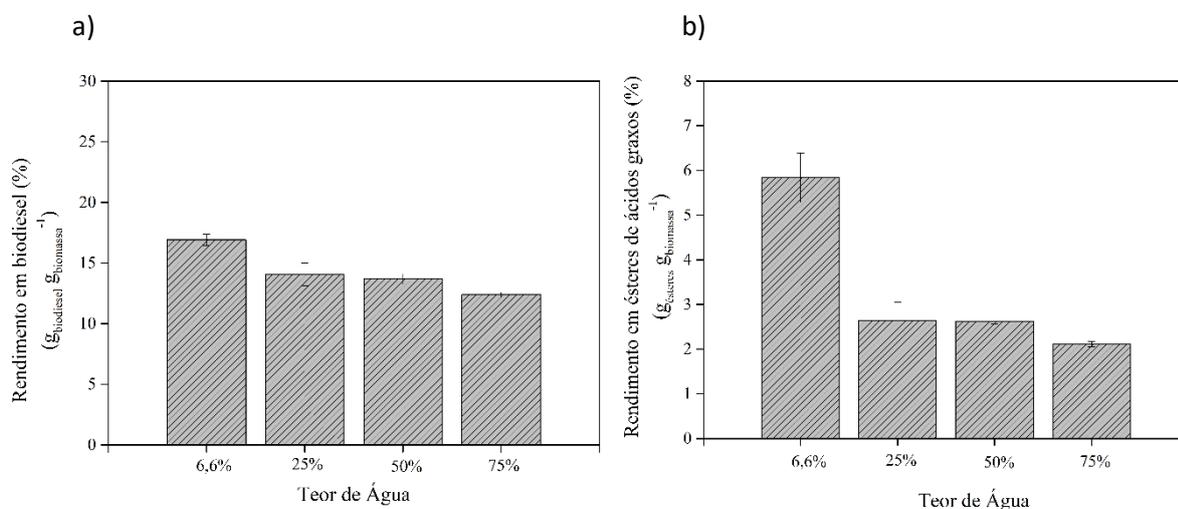


TABELA 25 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em biodiesel por biomassa seca % ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação *in situ* para variação no teor de água, nas condições: 65°C, 10:1:1 (metanol:HCl:Clorofórmio), no tempo de 4 horas.

Teor de água	Tukey
6,6%	16,918±0,456 ^a
25%	14,075±0,934 ^b
50%	13,678±0,424 ^b
75%	12,388±0,213 ^b

Johnson e Wen (2009) ao estudar a transesterificação *in situ* utilizando *Schizochytrium limacinum*, obtiveram em rendimento de biodiesel por biomassa de 66,97±1,70% para biomassa com 80% de umidade e 66,25±0,22% para biomassa seca, sendo a reação feita a 90°C por 40 minutos com clorofórmio. Valores bem próximos que não valeriam o custo de secagem da biomassa para o processo. Entretanto ao avaliar o teor de ésteres de ácidos graxos por biomassa obtiveram a diferença de 5,20±1,83 $\text{mg}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ para biomassa úmida e 42,05±2,12 $\text{mg}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ para biomassa seca. Valores não muito próximos ao encontrado nesse trabalho para biomassa com 6,6% de teor de água de 5,839±0,554% ou 58,39 $\text{mg}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Figura 39-b).

O teor de água ocasionou uma influência maior na diminuição do rendimento em ésteres, diminuindo cerca de 54% no valor da biomassa com 6,6% para a biomassa com 25% de água. A nível de 10% não houve diferença estatística no rendimento encontrado para o teor de água de 25%, 50% e 75% para Tukey (Tabela 26).

A água presente na biomassa pode afetar a eficiência do ácido utilizado como catalisador, fazendo com que ele se dilua, diminuindo suas forças e fazendo com que a velocidade da reação de transesterificação diminua, ocasionando uma menor conversão em ésteres.

Como há uma grande diferença no rendimento da reação de transesterificação entre as reações com biomassa seca (6,6% de água) e biomassa úmida, as próximas reações desse trabalho serão feitas a temperaturas abaixo de 90°C, utilizara-se de biomassa com teor 6,6% de água a fim de aumentar o rendimento das reações.

TABELA 26 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em ésteres de ácidos graxos por biomassa seca % ($\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) na reação de transesterificação *in situ* para variação no teor de água, nas condições: 65°C, na proporção em volume de 10:1:1 (metanol:HCl:Clorofórmio), no tempo de 4 horas.

Teor de água	Tukey
6,6%	5,839±0,554 ^a
25%	2,636±0,413 ^b
50%	2,617±0,052 ^b
75%	2,111±0,059 ^b

5.8.3 Efeito da quantidade de cossolvente na transesterificação *in situ*

No capítulo 5.7 foram testados os melhores solventes para extração de lipídios presentes nas células microalgais, diante dos resultados obtidos com uma melhor extração para clorofórmio e metanol, decidiu-se fazer uso do clorofórmio como cossolvente na transesterificação. Foram testadas 5 concentrações diferentes com o cossolvente e também testado a transesterificação *in situ* sem a introdução do clorofórmio (Figura 40-a). A proporção de solvente:catalisador foi de 10:1 em volume em 65°C por 4 horas. Realizou a ANOVA para a variável resposta rendimento em biodiesel da alteração na proporção do cossolvente, e verificado que há diferença estatística em pelo menos um valor de rendimento ($p < 0,10$) (Tabela 27).

TABELA 27 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) fator único para transesterificação *in situ* utilizando variação no teor de cossolvente, sendo a variável resposta rendimento em biodiesel.

Fator	SQ	g.l	QM	Fc	p-valor
Tratamentos	138,444	6	23,074	11,160	0,002771
Resíduos	14,474	7	2,068		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Fc: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de rendimento em biodiesel ($N = 2$) estimados em diferentes teores de cossolvente.

A adição de clorofórmio vez com que houvesse um aumento no rendimento da reação, o valor do rendimento para a reação sem a introdução de um cossolvente foi de $10,045 \pm 1,299\%$ ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$), valor estatisticamente não diferente a nível de 10% para o encontrado para o teor de 0,25 para o teste de Tukey (Tabela 28) Para o teor de 5,0

foi alcançado o rendimento de $19,330 \pm 0,821\%$ ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$), entretanto valor também não se difere a nível de 10% do rendimento obtido para o teor de 10 e para o teor 1, pelos resultados obtidos por Tukey.

FIGURA 40 - Reação de transesterificação *in situ* alterando o teor de cossolvente. Proporção em volume utilizada 10:1:X (Metanol:HCl:Clorofórmio), em 65°C, por 4 horas; a) rendimento biodiesel por biomassa seca; b) rendimento ésteres metílicos por biomassa seca.

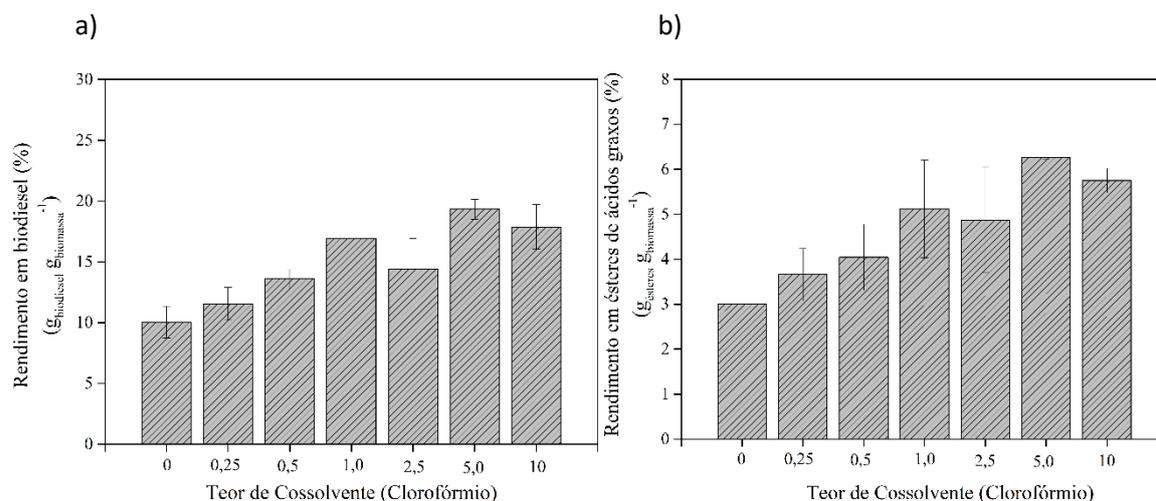


TABELA 28 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em Biodiesel % na reação de transesterificação *in situ* para variação nos teores de cossolvente nas condições: 65°C, proporção em volume de 10:1 (Metanol:HCl) e tempo de 4 horas.

Teor de cossolvente (Clorofórmio)	Tukey
0	10,045±1,299 ^c
0,25	11,556±1,334 ^c
0,5	13,589±0,793 ^{bc}
1	16,918±0,456 ^a
2,5	14,420±2,483 ^{bc}
5,0	19,330±0,821 ^a
10,0	17,878±1,822 ^{ab}

O rendimento em ésteres de ácidos graxos obteve como maior rendimento a proporção de 5 no valor de cossolvente ($6,266 \pm 0,046\%$ $\text{g}_{\text{ésteres}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) (Figura 40-b), porém segundo o teste de Tukey, o valor obtido para 5 no teor de cossolvente não se difere a nível de 10% dos valores obtidos para o teor de 10; 2,5; 1,0 e 0,5 (Tabela 29). Para a

reação sem a introdução de cossolvente houve uma diminuição de aproximadamente 21,74%, evidenciando a melhora na transesterificação *in situ* com a adição de cossolvente.

Kim *et al.* (2015) em seus estudos com a microalga *Nannochloropsis gaditana* conseguiu um aumento no rendimento de ésteres metílicos de $80,7 \pm 4,0\%$ para $85,7 \pm 1,7\%$ ao aumentar de 0,1 para 2 ml de clorofórmio na reação *in situ* a 95°C com 0,3 ml de HCl.

Para Thanh *et al.* (2022) os cossolventes podem ajudar na extração dos lipídios da biomassa em conjunto com o metanol, melhorando a difusão dos lipídios através da parede celular, sendo facilitado pela maior seletividade e solubilidade do meio de extração, propiciando assim uma maior acessibilidade do óleo para o processo de transesterificação. Taherkhani e Sadrameli (2018) advertem que o aumento do cossolvente a partir do ponto ótimo ocasiona uma diminuição no rendimento, já que ao adicionar uma quantidade excessiva de cossolvente pode ocasionar uma maior dificuldade no processo de separação do biodiesel do glicerol.

TABELA 29 - Teste de Tukey para variável resposta rendimento em ésteres metílicos na reação de transesterificação *in situ* para variação nos teores de cossolvente nas condições: 65°C , proporção em volume de 10:1 (metanol:HCl) e tempo de 4 horas.

Teor de cossolvente (Clorofórmio)	Tukey
0	$3,003 \pm 0,960^c$
0,25	$3,656 \pm 0,584^{bc}$
0,5	$4,044 \pm 0,736^{abc}$
1	$5,839 \pm 0,554^{ab}$
2,5	$4,871 \pm 1,172^{abc}$
5,0	$6,266 \pm 0,046^a$
10,0	$5,750 \pm 0,273^{ab}$

5.8.4 Resultado do planejamento experimental

A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos nos 15 experimentos do planejamento experimental Box-Behnken para obtenção dos melhores valores nos parâmetros para produção de biodiesel *in situ* utilizando a microalga *Poteroochromonas malhamensis*. Temperatura, volume do catalisador (HCl) e volume de solvente foram os parâmetros analisados, obtendo como resposta o rendimento em biodiesel ($\text{g}_{\text{biodiesel}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$). Outros parâmetros como cossolvente, teor de água, tempo de reação e tipo de álcool, foi determinado a partir dos resultados obtidos nos tópicos 5.8.1; 5.8.2 e 5.8.3, os quais foram:

6,6% no teor de água presente na biomassa, 4 horas de reação, álcool metanol e teor de cossolvente (clorofórmio) de 5 na proporção em volume solvente:catalisador:cossolvente .

Pode-se observar que o melhor rendimento ($22,258 \text{ \% } g_{\text{biodiesel}} g_{\text{biomassa}}^{-1}$) ocorreu na temperatura de 90°C e na quantidade de 2,50 mL de solvente e 0,45 mL para o HCl, sendo em proporções em volume equivalente a 10:1,8:5 evidenciando que o aumento na proporção de catalisador ou o aumento de temperatura, gera um aumento no rendimento em biodiesel, visto que na Figura 40-a o rendimento obtido para a proporção 10:1:5 a 65°C foi de $19,330 \pm 0,821 \text{ \% } (g_{\text{biodiesel}} g_{\text{biomassa}}^{-1})$. Entretanto na questão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), essas condições não obtiveram o melhor resultado no planejamento experimental. Sendo o melhor resultado alcançado pelos pontos centrais a 65°C na proporção 10:1:5. Kim *et al.* (2015) em seus estudos também obteve melhor rendimento em FAME (100,18% - valor relativo ao melhor resultado de FAME obtido na extração por Bligh and Dyer) quando utilizou a proporção 10:1:5 na reação direta com a *Nannochloropsis gaditana* durante 2 horas a 95°C .

Quando analisado a composição dos ácidos graxos entre o menor e maior rendimento em FAME, para identificar se há uma discrepância a partir da alteração das variáveis, obtemos para o experimento 3 do planejamento experimental: 49,87% ácidos graxos saturados, 11,24 % monoinsaturados e 38,89% em poliinsaturado. Para o experimento 13 foi obtido: 50,26% saturados, 7,88% monoinsaturado e 41,84% em poliinsaturado. Indicando que há diferença na composição do FAME, e essa diferença pode chegar a aproximadamente 30% nos ácidos graxos monoinsaturados.

TABELA 30 - Condições experimentais e resultados do rendimento em biodiesel para as reações de transesterificação in situ com a *P. malhamensis*.

Experimento	q1: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	q2: Catalisador (mL)	q3: Solvente (mL)	Rendimento em biodiesel (%)	Rendimento em FAME (%)
1	40,00	0,05	2,50	17,521	5,986194
2	90,00	0,05	2,50	17,509	4,161738
3	40,00	0,45	2,50	18,672	1,599143
4	90,00	0,45	2,50	22,258	4,30141
5	40,00	0,25	0,50	19,028	3,532504
6	90,00	0,25	0,50	18,468	2,184637
7	40,00	0,25	4,50	20,000	2,664511

8	90,00	0,25	4,50	19,607	3,578379
9	65,00	0,05	0,50	18,137	5,020995
10	65,00	0,45	0,50	18,791	3,502876
11	65,00	0,05	4,50	19,155	4,428646
12	65,00	0,45	4,50	19,155	4,262427
13	65,00	0,25	2,50	18,730	7,213024
14	65,00	0,25	2,50	18,773	5,91357
15	65,00	0,25	2,50	19,455	6,175249

5.8.4.1 Resultados do rendimento em biodiesel

Os efeitos das variações em temperatura (q_1 ; °C), quantidade de catalisador (q_2 ; volume) e quantidade de solvente (q_3 ; volume) foram estimados ao nível de 10%, e a biomassa utilizada na transesterificação direta foi obtida no 25° dia de cultivo e possuindo $12,101 \pm 0,657\%$ de lipídios totais em sua composição.

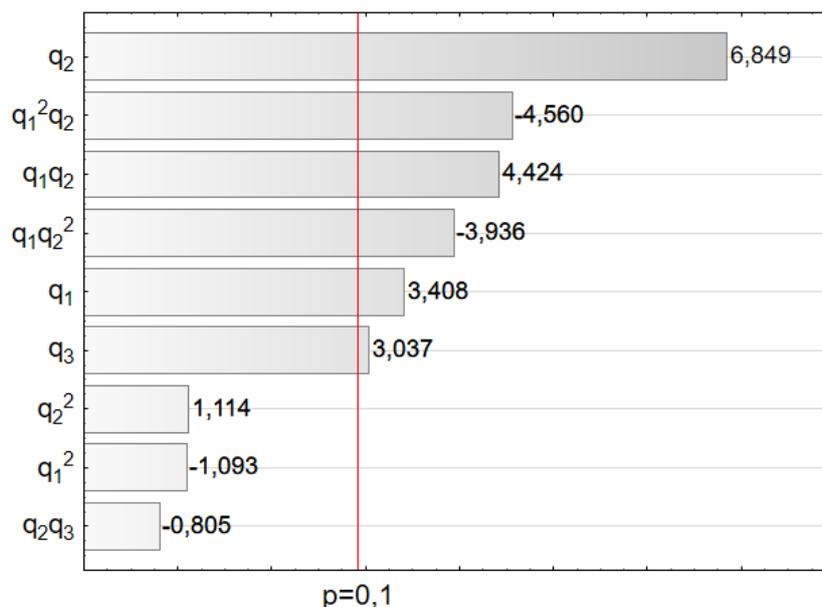
A representatividade dos efeitos significativos (p-valor < 0,10) dentro da região de planejamento experimental Box-Behnken foi verificada pela estatística *t-Student* e análise de variância – ANOVA. A relevância dos efeitos significativos (p-valor < 0,10) são apresentados no gráfico de Pareto (Figura 41).

Indica-se que o aumento no rendimento do biodiesel foi favorecido pelo aumento linear do volume de catalisador na reação *in situ* (*t-Student* = 6,849) e ao volume linear de solvente (metanol) (*t-Student* = 3,037) e também pela temperatura linear da reação (*t-Student* = 3,408) Os efeitos referentes às interações ($q_1^2:q_2$), ($q_1:q_2$) e ($q_1:q_2^2$) entre a temperatura e o volume de catalisador também mostraram contribuição para o rendimento da reação. Logo, observou-se pela análise de variância – ANOVA das fontes de variação e ajuste do modelo aos dados experimentais, cujos resultados são apresentados na Tabela 31, a interação da temperatura com variação do volume de catalisador na reação foi o maior responsável pelo aumento no rendimento em biodiesel, segundo o valor da soma dos quadrados (SQ = 9,236).

Pela resultados obtidos na ANOVA, o valor da soma dos quadrados (SQ = 7,960) indicou que a variação do volume de catalisador linear e quadrático gerou grande influência na reação *in situ*. Porém a temperatura isolada pelo valor da soma dos

quadrados ($SQ = 2,118$) não demonstrou nenhum efeito estatisticamente significativo ($p\text{-valor} = 0,135$) sobre a resposta rendimento da reação.

FIGURA 41 -Pareto dos efeitos linear (q_i), quadrático (q_i^2) e de interações ($q_i:q_j$) das variáveis independentes: temperatura (q_1 ; °C), quantidade de catalisador (q_2 ; volume) e quantidade de solvente (q_3 ; volume) sobre o rendimento em biodiesel % ($g_{\text{biodiesel}} g_{\text{biomassa}}^{-1}$) na transesterificação direta utilizando a *P. malhamensis*.



Durante o processo de ajuste do modelo de regressão, alguns efeitos não significativos ($p\text{-valor} > 0,1$) foram excluídos conforme o critério de melhor coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{\text{ajust.}}$), porém, alguns efeitos não significativos permaneceram, pois foram fundamentais para descrever o processo.

Nas condições em que F calculado $>$ F tabelado, o modelo quadrático proposto foi validado, já que F calculado (28,039) é maior que F tabelado (3,316), para o intervalo de confiança de 90%. O F calculado foi determinado levando em consideração os graus de liberdade referentes aos parâmetros significativos (regressão) e aos resíduos. A boa reprodutibilidade dos dados experimentais obtidos para o parâmetro de resposta, foi confirmada com o bom ajuste dos dados experimentais para o aumento no rendimento do biodiesel ($R^2 = 0,977$ e $R_{\text{ajustado}} = 0,935$).

TABELA 31 - ANOVA das fontes de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados rendimento em biodiesel obtidos na transesterificação direta da microalga *P. malhamensis*.

Fonte	Coefficiente	SQ	g.l	QM	F	p-valor
Temperatura (L+Q)	q ₁	2,118	2	1,059	6,407	0,135
Catalisador (L+Q)	q ₂	7,960	2	3,980	24,078	0,039
Solvente (L+Q)	q ₃	1,525	1	1,525	9,228	0,093
Temperatura:Catalisador	q ₁ : q ₂	9,236	3	3,078	18,625	0,051
Temperatura:Solvente	q ₁ : q ₃	0,107	1	0,107	0,648	0,505
Regressão		20,94	9	2,327	28,039	0,0009
Falta de ajuste		0,084	3	0,028	0,170	0,908
Erro puro		0,330	2	0,165		
Resíduos		0,415	5	0,083		
Total		21,36	14			

Os valores destacados em negrito representam as fontes de variação com efeito estatisticamente significativo ao nível de 10% (p-valor <0,10). g.l: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; L: linear; Q: quadrático.

O modelo de regressão descrevendo o aumento do rendimento de biodiesel durante a reação é apresentado pela Equação 15 considerando-se os coeficientes significativos.

Equação 15

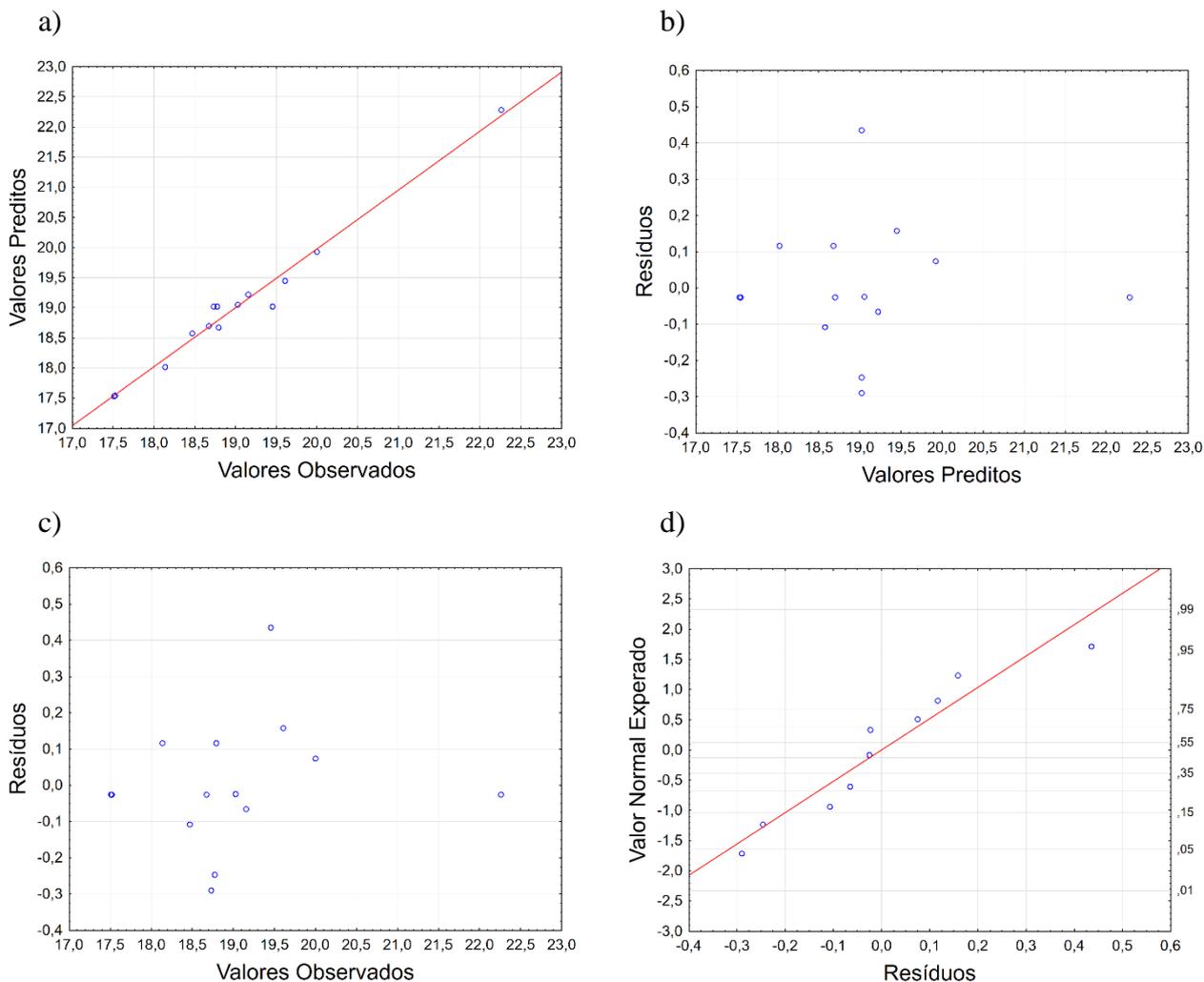
$$\text{Rendimento em biodiesel \% (g}_{\text{biodiesel}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}) = 7,0711 + 0,3092q_1 - 0,0023q_1^2 + 74,1881q_2 - 79,4398q_2^2 + 0,3206q_3 - 1,7497q_1q_2 + 1,1317q_1q_2^2 + 0,0105q_1^2q_2 - 0,4092q_2q_3$$

Pode-se verificar que o modelo de segunda ordem proposto descreve o comportamento das variáveis estudadas, como mostrado na Figura 42-a), para rendimento em biodiesel, onde confrontam-se os valores preditos com os observados experimentalmente. Nesta figura é possível verificar também que os dados experimentais se ajustaram bem, dentro da esperada variabilidade inerente do processo experimental.

Na Figura 42-b) apresenta-se o comportamento dos resíduos relativo aos seus correspondentes valores preditos. Essa análise demonstra que um modelo quadrático capaz de considerar as interações de segunda ordem entre três fatores é suficiente para correlacionar adequadamente as variáveis independentes (temperatura, catalisador e solvente) com a variável resposta (% rendimento em biodiesel). Uma distribuição homogênea também foi verificada entre as diferentes condições experimentais testadas (Figura 42-c), o que indicou a independência entre as 15 reações *in situ* realizados

conforme o planejamento Box-Behnken. Já na Figura 42-d observa-se que os resíduos dos ajustes seguiram a distribuição normal.

FIGURA 42 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste do modelo aos dados rendimento em biodiesel: (a) Correlação entre os valores preditos e observados; (b) Homoscedasticidade dos resíduos versus valores preditos pelo modelo; (c) Independência dos resíduos versus ensaio experimental; d) Normalidade dos resíduos.



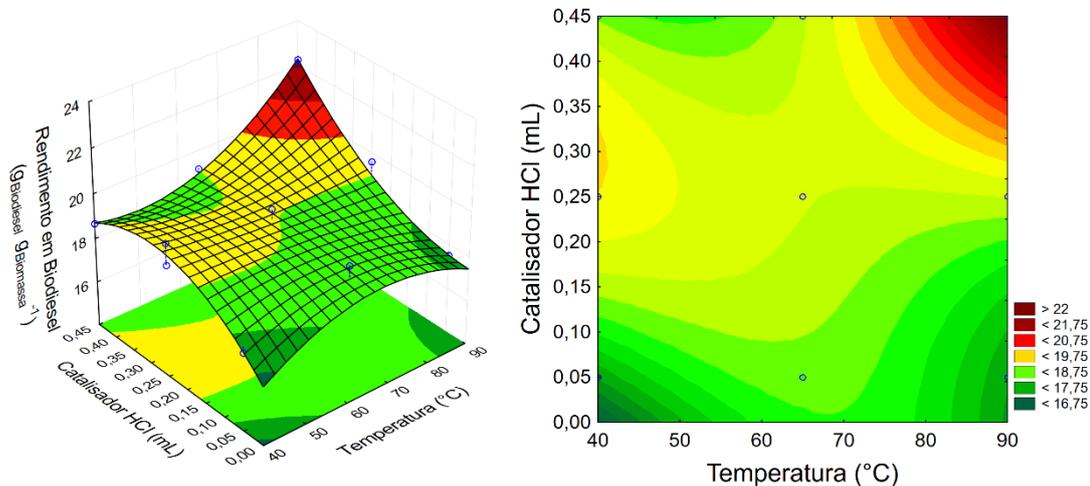
Para visualizar a interação entre as variáveis, utilizou-se o ajuste por superfícies de resposta. Estas superfícies encontram-se ilustradas na Figura 43. A partir da Figura 43-a) observa-se que, fixando o volume de solvente em 2,5 mL, o máximo rendimento em biodiesel ocorreu na faixa onde a maior temperatura (100°C) interage com o maior volume de catalisador (0,50 mL). Conforme analisado anteriormente, verifica-se a forte dependência da eficiência na transesterificação *in situ* com a quantidade catalisador.

Conforme pode ser observado na Figura 43-b), quando o volume de catalisador é fixado em 0,25, verifica-se que o rendimento em biodiesel depende do volume do solvente utilizado.

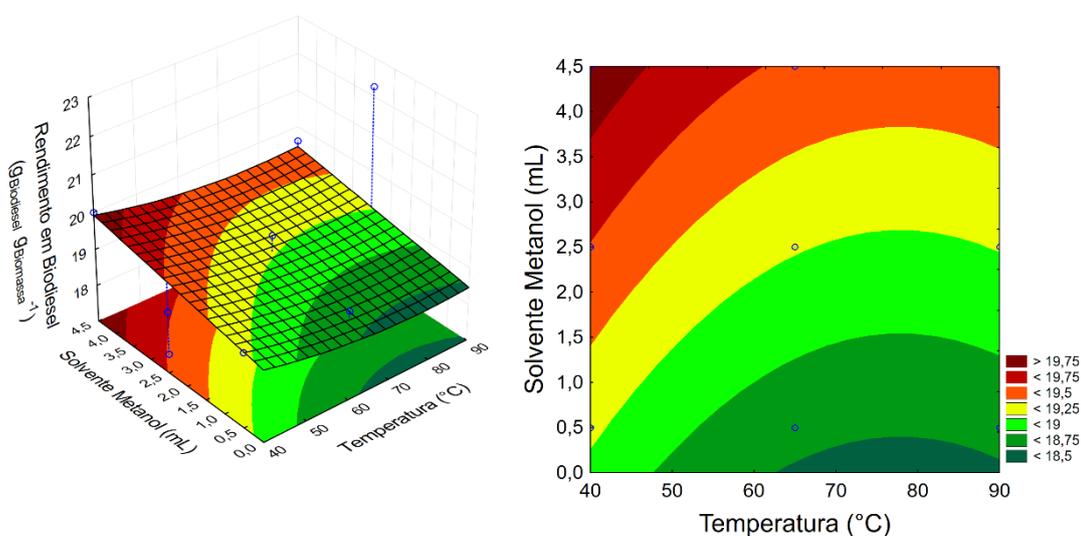
Com a temperatura fixa em 65°C (Figura 43-c) verifica-se um maior rendimento em biodiesel quando o volume do catalisador está próximo de 0,25 mL e a quantidade de solvente está em 4 mL.

FIGURA 43 - Superfícies de resposta dos resultados experimentais obtidos no planejamento Box-Behnken para rendimento em biodiesel quando (a) volume do solvente (metanol) fixado em 2,5 mL (b) volume do catalisador (HCl) fixado em 0,25 mL (c) temperatura fixada em 65°C.

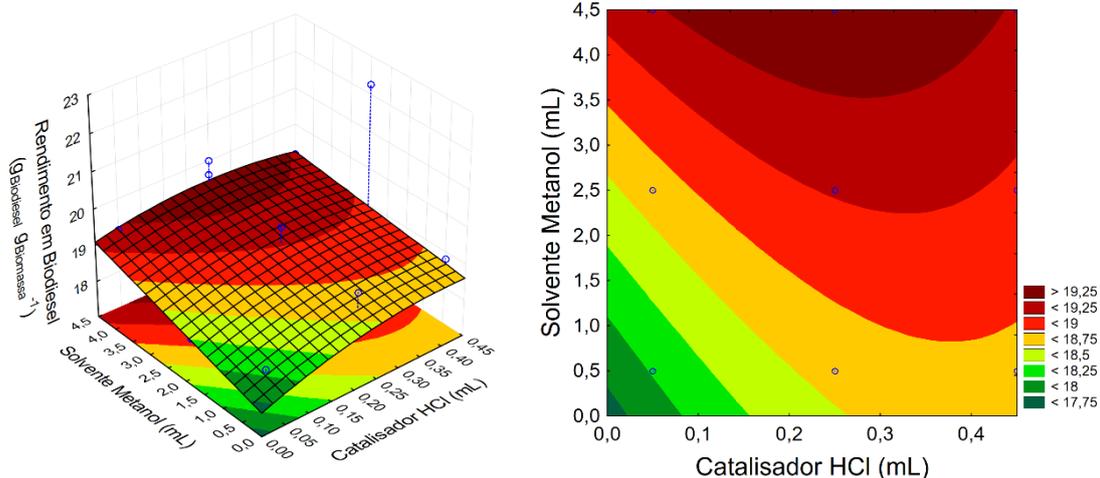
a)



b)



c)



5.8.4.2 Resultados do rendimento em FAME

Da mesma forma como para o rendimento em biodiesel, realizou-se um planejamento experimental Box-Behnken para o rendimento em FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos). A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos nos 15 experimentos do planejamento.

Os efeitos das variações em temperatura (q_1 ; °C), quantidade de catalisador (q_2 ; volume) e quantidade de solvente (q_3 ; volume) foram estimados ao nível de 10%. A representatividade dos efeitos significativos (p -valor $< 0,10$) dentro da região de planejamento experimental foi verificada pela estatística *t-Student* e análise de variância – ANOVA. A relevância dos efeitos significativos (p -valor $< 0,10$) são apresentados no gráfico de Pareto (Figura 44).

Indica-se que o aumento no rendimento em FAME foi favorecido pelo aumento quadrático da temperatura (t -Student = 5,222) e ao aumento quadrático do volume de solvente (metanol) (t -Student = 4,407). O volume de catalisador linear igualmente teve efeito nos resultados de rendimento (t -Student = -3,312), e os efeitos referentes à interação ($q_1:q_2$) entre a temperatura e o volume de catalisador também mostraram contribuição para o rendimento da reação.

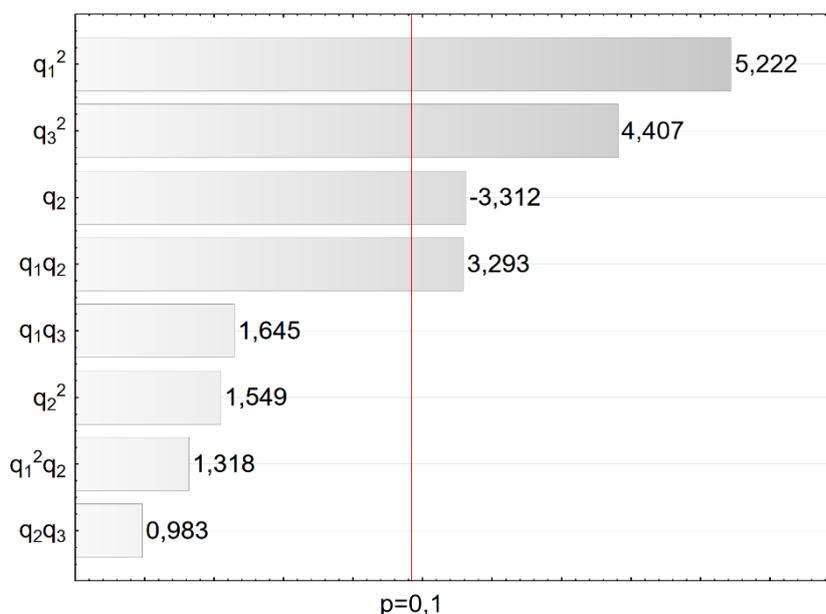
Logo, observou-se pela análise de variância – ANOVA das fontes de variação e ajuste do modelo aos dados experimentais, cujos resultados são apresentados na Tabela 32, a temperatura foi a maior responsável pelo aumento no rendimento em FAME, segundo o valor da soma dos quadrados (SQ = 12,880), seguido da variação do volume de álcool (SQ = 9,172). Resultado oposto ao encontrado para o planejamento experimental com resposta

em quantidade de biodiesel, onde foi encontrado a maior soma dos quadrados para o volume de catalisador, o qual não apresentou um valor significativo na ANOVA desse planejamento.

Da mesma forma do planejamento experimental para a quantidade de biodiesel, o processo de ajuste do modelo de regressão, alguns efeitos não significativos (p -valor $< 0,1$) foram excluídos conforme o critério de melhor coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajust.}$), porém, alguns efeitos não significativos permaneceram, pois foram fundamentais para descrever o processo.

Nas condições em que F calculado $> F$ tabelado, o modelo quadrático proposto foi validado, já que F calculado (21,454) é maior que F tabelado (2,98), para o intervalo de confiança de 90%. O F calculado foi determinado levando em consideração os graus de liberdade referentes aos parâmetros significativos (regressão) e aos resíduos. A boa reprodutividade dos dados experimentais obtidos para o parâmetro de resposta, foi confirmada com o bom ajuste dos dados experimentais para o aumento no rendimento do biodiesel ($R^2 = 0,963$ e $R_{ajustado} = 0,914$).

FIGURA 44 - Pareto dos efeitos linear (q_i), quadrático (q_i^2) e de interações ($q_i:q_j$) das variáveis independentes: temperatura (q_1 ; °C), quantidade de catalisador (q_2 ; volume) e quantidade de solvente (q_3 ; volume) sobre o rendimento em FAME % ($\text{g}_{ésteres} \text{g}_{biomassa}^{-1}$) na transesterificação direta utilizando a *P. malhamensis*.



O modelo de regressão descrevendo o aumento do rendimento em ésteres metílicos de ácidos graxos durante a transesterificação direta é apresentado pela Equação 16 considerando-se os coeficientes significativos.

TABELA 32 - ANOVA das fontes de variação e do modelo de regressão ajustado aos dados rendimento em FAME obtidos na transesterificação *in situ*.

Fonte	Coefficiente	SQ	g.l	QM	F	p-valor
Temperatura (L+Q)	q ₁	12,880	1	12,880	27,27058	0,034
Catalisador (L+Q)	q ₂	6,314	2	3,157	6,68390	0,130
Solvente (L+Q)	q ₃	9,172	1	9,172	19,41987	0,047
Temperatura:Catalisador	q ₁ : q ₂	5,943	2	2,971	6,29204	0,1373
Temperatura:Solvente	q ₁ : q ₃	1,278	1	1,278	2,70751	0,241
Catalisador:Solvente	q ₁ : q ₃	0,456	1	0,456	0,96733	0,429
Regressão		36,047	8	4,506	21,44844	0,000
Falta de ajuste		0,315	4	0,079	0,16716	0,937
Erro puro		0,944	2	0,472		
Resíduos		1,260	6	0,210		
Total		37,308	14			

Os valores destacados em negrito representam as fontes de variação com efeito estatisticamente significativo ao nível de 10% (p-valor <0,10). g.l: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; L: linear; Q: quadrático.

Equação 16

$$\text{Rendimento em Ésteres (g}_{\text{ésteres}} \text{ g}_{\text{biomassa}}^{-1}) = 7,8600 - 0,0008q_1^2 - 45,6674q_2 - 12,9050q_2^2 + 0,3033q_3^2 + 1,2350q_1q_2 - 0,0077q_1^2q_2 + 0,0187q_1q_3 + 1,2511q_2q_3$$

Verifica-se que o modelo de segunda ordem proposto descreve o comportamento das variáveis estudadas, como mostrado na Figura 45-a), para rendimento em FAME. A Figura 45-b) demonstra que o pressuposto de homocedasticidade foi atendido. Uma distribuição homogênea também foi verificada entre as diferentes condições experimentais testadas (Figura 45-c), o que indicou a independência entre as 15 reações *in situ* realizados conforme o planejamento Box-Behnken. Já na Figura 45-d observa-se que os resíduos dos ajustes seguiram a distribuição normal.

Para visualizar a interação entre as variáveis, utilizou-se o ajuste por superfícies de resposta. Estas superfícies encontram-se ilustradas na Figura 46. A partir da Figura 46-a) observa-se que, fixando o volume de solvente em 2,5 mL, o máximo rendimento em FAMES ocorreu na faixa em torno do ponto central a 65°C e 0,25 mL de HCl.

Com a temperatura fixa em 65°C (Figura 46-b) verifica-se um maior rendimento em ésteres de ácidos graxos quando o volume do catalisar está próximo de 0,25 mL e a quantidade de solvente está em 2,5 mL.

Conforme pode ser observado na Figura 46-c), quando o volume de catalisador é fixado em 0,25, verifica-se que o rendimento em FAME também se encontra nos pontos centrais do planejamento, sendo a 65°C e 2,5 mL de álcool.

Ao analisar ambos os resultados dos planejamentos experimentais identificamos que para obter melhor rendimento em biodiesel e para obter melhor resultado em FAME, condições diferentes devem ser usadas para alcançar o melhor resultado. Para o rendimento em FAME os melhores resultados obtidos foram os pontos centrais, que corroboram com os resultados obtidos da literatura.

Para o rendimento em biodiesel, todos os resultados obtidos divergem do ponto central. Esse fato pode estar associado com a composição do biodiesel final, onde a medição é feita de forma gravimétrica, porém pode haver uma quantidade significativa de ácidos graxos livres que não reagiram na reação de transesterificação direta, e sua massa é levada em conta na quantificação do biodiesel, porém na quantificação dos FAME's não, visto que a coluna da cromatografia gasosa, só identifica ésteres de ácidos graxos.

FIGURA 45 - Avaliação gráfica dos resíduos de ajuste do modelo aos dados rendimento em FAME: (a) Correlação entre os valores preditos e observados; (b) Homoscedasticidade dos resíduos versus valores preditos pelo modelo; (c) Independência dos resíduos versus ensaio experimental; d) Normalidade dos resíduos.

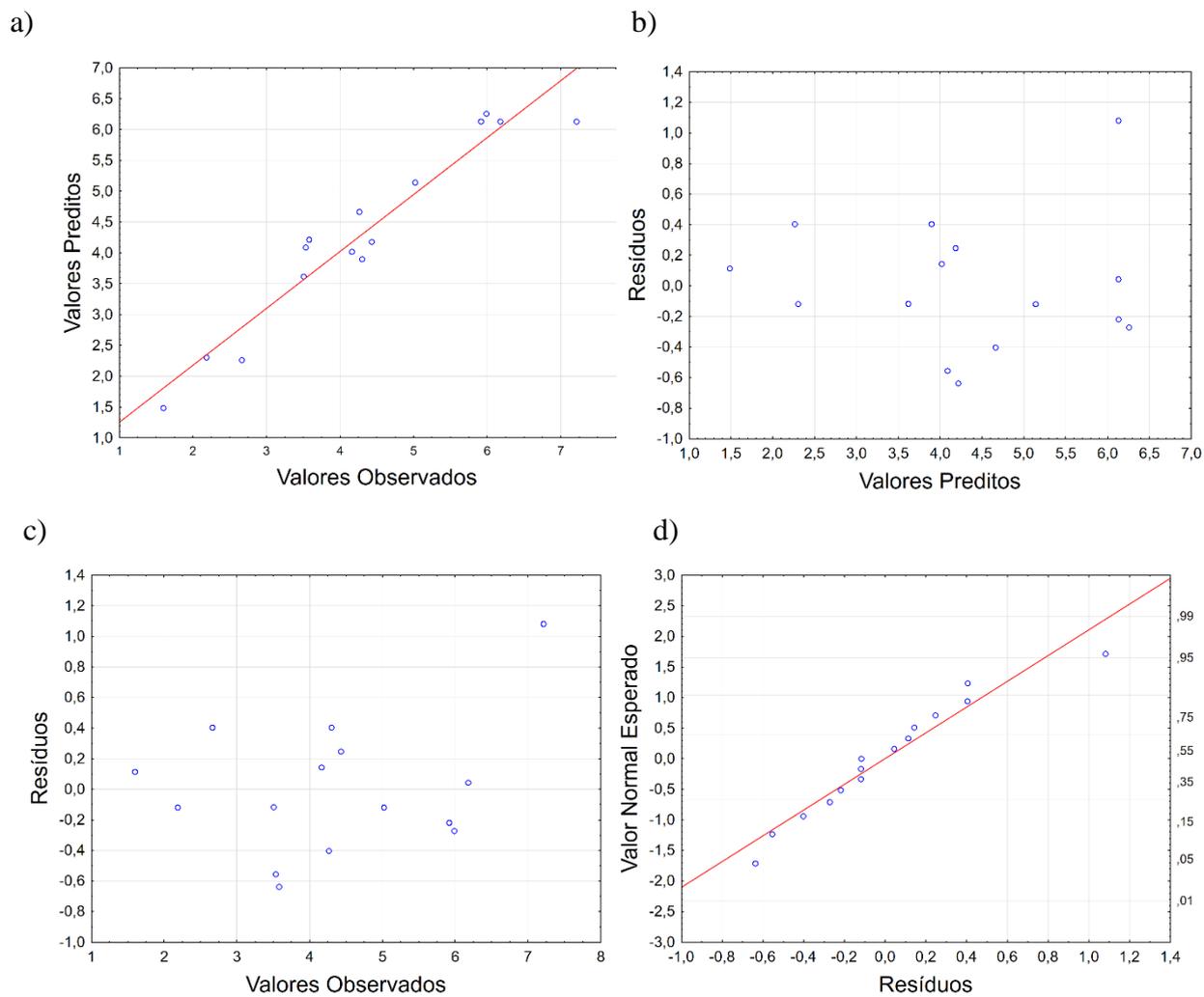
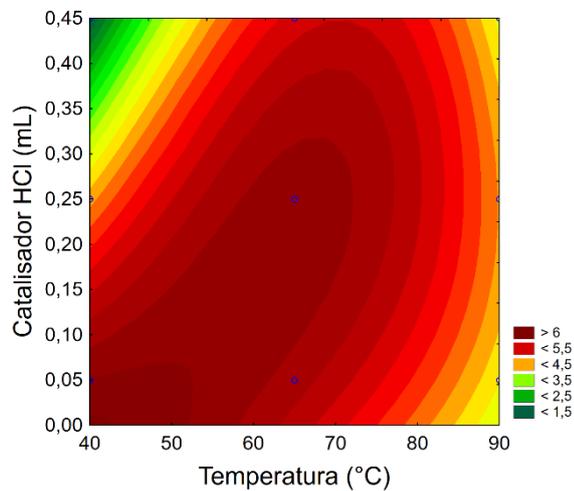
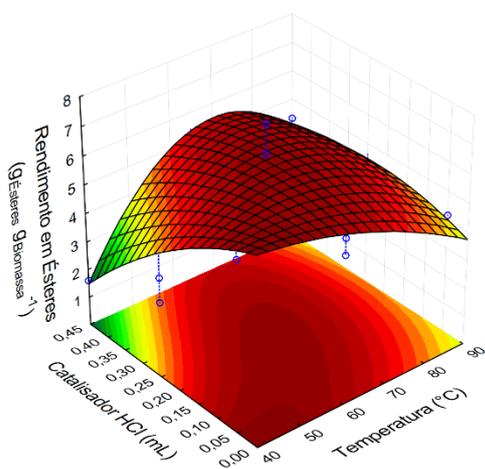
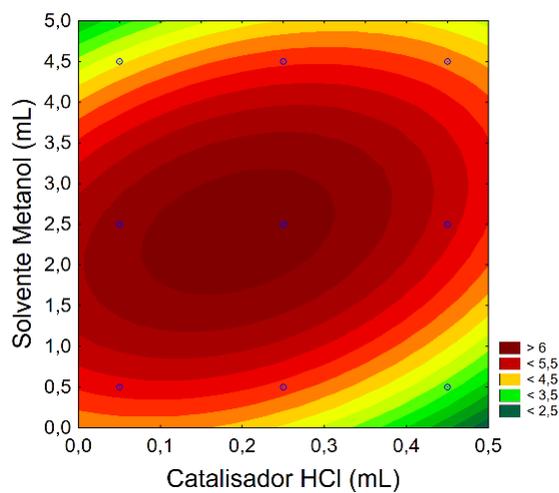
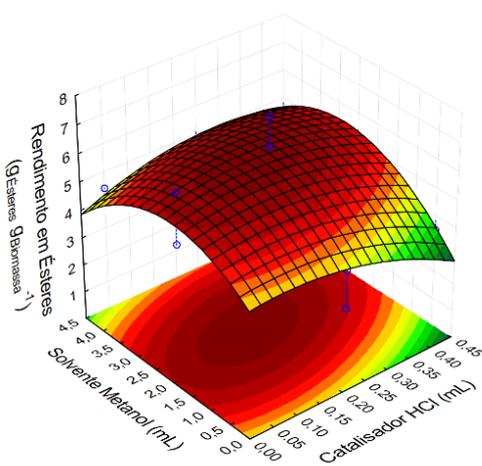


FIGURA 46 - Superfícies de resposta dos resultados experimentais obtidos no planejamento Box-Behnken para rendimento em biodiesel quando (a) volume do solvente (metanol) fixado em 2,5 mL (b) volume do catalisador (HCl) fixado em 0,25 mL (c) temperatura fixada em 65°C.

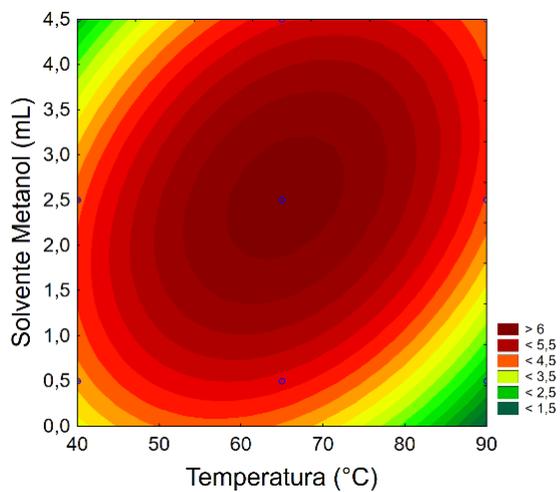
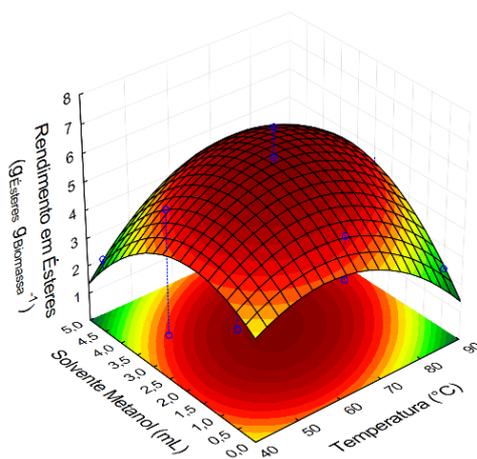
a)



b)



c)



CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

Para um cultivo de ultra alta densidade da microalga *Poterioochromonas malhamensis*, utilizando uma vazão de 8% de dióxido de carbono, temperaturas em torno de 29°C, pH de aproximadamente 7,3, iluminação total de $\sim 590 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e vazão de mistura de gases como agitação de $1,20 \text{ L L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, os resultados dos experimentos de cultivo mostraram ser indispensável fazer-se o uso de reposição de micronutrientes a partir do 8 dia de cultivo.

A suplementação de micronutrientes conseguiu aumentar as taxas de produção de clorofila *a* em aproximadamente $59\% \mu\text{g mL}^{-1}$, devido o cultivo atingir a alta densidade de biomassa, porém quando analisado por mg g^{-1} a não suplementação alcançou cerca de 15% a mais de clorofila *a*. O mesmo ocorreu para clorofila *b*, que em termos de $\mu\text{g mL}^{-1}$ conseguiu aproximadamente 57% a mais com o cultivo suplementado, contudo obteve 15% a mais de clorofila *b* em mg g^{-1} o cultivo sem a suplementação. Para carotenoides o aumento com a suplementação obteve aproximadamente $70\% \mu\text{g mL}^{-1}$ e $25\% \text{ mg g}^{-1}$. As altas taxas de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides torna o cultivo de *P. malhamensis* uma boa opção para cultivo visando a produção de bio-produtos, ou para a utilização como suplementação em ração animal.

Ao utilizar a técnica de extração sucessiva para a retirada dos lipídios totais presentes na biomassa, alcançou-se $24,344 \pm 0,957\% \text{ g g}^{-1}$ utilizando a biomassa suplementada com micronutrientes durante seu cultivo e $18,491 \pm 0,237\% \text{ g g}^{-1}$ quando utilizada a biomassa não suplementada. Evidenciando os benefícios do cultivo suplementado com micronutrientes e o potencial dessa cepa para a extração do seu óleo.

Dentre as técnicas avaliadas para extração de lipídios totais da *P. malhamensis*, tanto para extrações feitas com solvente aquecido e solvente a frio, o melhor conjunto de solventes para conseguir retirar o maior número de lipídio da célula, foi a mistura metanol e clorofórmio, alcançando melhor resultado para extração via soxhlet e sucessiva, entretanto devido a quantidade de solvente utilizada em cada uma, a extração sucessiva é a mais vantajosa economicamente. Na questão dos ácidos graxos, os lipídios mostraram, em nas extrações a quente e a frio, uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados, mostrando ser um óleo ideal para consumo. Entretando, na extração supercrítica, a

quantidade de ácidos graxos saturados foi de aproximadamente 62% da composição total dos ácidos graxos.

Na transformação de lipídios em biodiesel sem a etapa de extração conclui-se que o álcool metanol é capaz de produzir um maior rendimento de FAME quando comparado com o etanol, além da presença de água na biomassa faz com que a reação catalisada por ácido alcance menores rendimentos quando comparada com a reação com a biomassa seca. O teor de cossolvente (clorofórmio) ajuda a transesterificação *in situ* aumentar seu rendimento em biodiesel e em FAME.

Pelo planejamento experimental Box-Behnken é possível notar a alta influência dos parâmetros temperatura, volume de catalisador e volume de solvente na reação *in situ*. Sendo que o rendimento em FAME obteve seu melhor rendimento por grama de biomassa nos pontos centrais: 65°C, 0,25 mL e 2,5 mL. E o rendimento em biodiesel alcançou o maior rendimento de 22 g por g de biomassa com 2,5 mL de solvente, 0,45 mL de catalisador e 90°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINANDAN, S., SUBASHCHANDRABOSE, S. R., VENKATESWARLU, K., & MEGHARAJ, M. (2019). Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. *Critical reviews in biotechnology*, 39(8), 981-998.

ABU-GHOSH, S., DUBINSKY, Z., VERDELHO, V., & ILUZ, D. (2021). Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 124895.

ABURAI, N., KUNISHIMA, R., IJIMA, F., & FUJII, K. (2020). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on lipid production of the aerial microalga *Coccomyxa* sp. KGU-D001 under liquid-and aerial-phase conditions. *Journal of Biotechnology*, 323, 274-282.

ALMUTAIRI, A. W., EL-SAYED, A. E. K. B., & MARWA, R. M. (2021). Evaluation of high salinity adaptation for lipid bio accumulation in the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7), 3981-3988.

AMORIM, M. L., SOARES, J., VIEIRA, B. B., BATISTA-SILVA, W., & MARTINS, M. A. (2020). Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. *Bioresource technology*, 307, 123190.

ANDERSEN, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier. Academic Press.

ANDERSEN, R. A., & WETHERBEE, R. (1992). Microtubules of the flagellar apparatus are active during prey capture in the chrysophycean alga *Epipyxis pulchra*. *Protoplasma*, 166(1), 8-20.

ANDRADE, D. S., & COLOZZI FILHO, A. (2014). Potencialidades e desafios do cultivo. *Microalgas de águas continentais*.

ANDRADE, M. R., & COSTA, J. A. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264(1-4), 130-134.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2021). Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel#wrapper>. Consultado em 11/05/2021.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2020). Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-45-2014?origin=instituicao>. Consultado em 11/05/2021.

ANTO, S., UM

ARAÚJO, G. S., MATOS, L. J., FERNANDES, J. O., CARTAXO, S. J., GONÇALVES, L. R., FERNANDES, F. A., & FARIAS, W. R. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 95-98.

ASSIS, L. M., SEBASTIÃO SILVA PINTO, J., & MAURO LANÇAS, F. (2000). Comparison among different extraction methods (PFE, SFE, Sonication, Soxhlet) for the isolation of organic compounds from coal. *Journal of Microcolumn Separations*, 12(5), 292-301.

BABADI, F. E., BOONNOUN, P., NOOTONG, K., POWTONGSOOK, S., GOTO, M., & SHOTIPRUK, A. (2020). Identification of carotenoids and chlorophylls from green algae *Chlorococcum humicola* and extraction by liquefied dimethyl ether. *Food and Bioproducts Processing*, 123, 296-303.

BAE, M., KIM, M. B., PARK, Y. K., & LEE, J. Y. (2020). Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 158618.

BAJPAI, S., SAHOO, P. K., & DAS, L. M. (2009). Feasibility of blending karanja vegetable oil in petro-diesel and utilization in a direct injection diesel engine. *Fuel*, 88(4), 705-711.

BAKER, R., & GÜNTHER, C. (2004). The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 484-488.

BALDAUF, S. L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution*, 46(3), 263-273.

BARROS, A. I., GONÇALVES, A. L., SIMÕES, M., & PIRES, J. C. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 41, 1489-1500.

BARRUT, B., BLANCHETON, J. P., MULLER-FEUGA, A., RENÉ, F., NARVÁEZ, C., CHAMPAGNE, J. Y., & GRASMICK, A. (2013). Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting. *Bioresource technology*, 128, 235-240.

BARSANTI, L., COLTELLI, P., EVANGELISTA, V., FRASSANITO, A. M., PASSARELLI, V., VESENTINI, N., & GUALTIERI, P. (2008). The world of algae. In *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection* (pp. 1-15). Springer, Dordrecht.

BAUMGARTNER, T. R. S., BURAK, J. A. M., BAUMGARTNER, D., ZANIN, G. M., & ARROYO, P. A. (2013). Biomass production and ester synthesis by in situ transesterification/esterification using the microalga *Spirulina platensis*. *International Journal of Chemical Engineering*.

BECKER, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.

BECKER, W. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology an Applied Phycology*; Richmond, A., Ed.

BELLOU, S., BAESHEN, M. N., ELAZZAZY, A. M., AGGELI, D., SAYEGH, F., & AGGELIS, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476-1493.

BERMUDEZ-SIERRA, J. J. (2018). Extração de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. Com diferentes mistura de solventes orgânicos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(2), 88-98.

- BHATTACHARYA, M., & GOSWAMI, S. (2020). Microalgae—a green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101580.
- BHUYAR, P., SUNDARARAJU, S., RAHIM, M. H. A., MANIAM, G. P., & GOVINDAN, N. (2021). Enhanced productivity of lipid extraction by urea stress conditions on marine microalgae *Coelastrum* sp. for improved biodiesel production. *Bioresource Technology Reports*, 100696.
- BICUDO, C. E. M., MENEZES, M. (2006). Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições. *Editora RIMA*, São Carlos.
- BLIGH, E. G., & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- BOXHORN, J. E., HOLEN, D. A., & BORAAS, M. E. (1998). Toxicity of the Chrysophyte flagellate *Poteroochromonas malhamensis* to the rotifer *Brachionus angularis*. *Hydrobiologia*, 387, 283-287.
- BOYD, C. E., & MARTINSON, D. J. (1984). Evaluation of propeller-aspirator-pump aerators. *Aquaculture*, 36(3), 283-292.
- BRENNAN, L., & OWENDE, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.
- BREUER, G., EVERS, W. A., DE VREE, J. H., KLEINEGRIS, D. M., MARTENS, D. E., WIJFFELS, R. H., & LAMERS, P. P. (2013). Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (80).
- BÜCHEL, C. (2020). Light-Harvesting Complexes of Diatoms: Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins. In *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms* (pp. 441-457). Springer, Cham.
- BUMBAK, F., COOK, S., ZACHLEDER, V., HAUSER, S., & KOVAR, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 31-46.

BUNDHOO, Z. M. (2018). Microwave-assisted conversion of biomass and waste materials to biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1149-1177.

CASTRO, J. S., CALIJURI, M. L., FERREIRA, J., ASSEMANY, P. P., & RIBEIRO, V. J. (2020). Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. *Science of The Total Environment*, 724, 138138.

CAO, H., ZHANG, Z., WU, X., & MIAO, X. (2013). Direct biodiesel production from wet microalgae biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through in situ transesterification. *Biomed Res.*

CERTIK, M., & SHIMIZU, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1–14.

CHAICHALERM, S., POKETHITIYOOK, P., YUAN, W., MEETAM, M., SRITONG, K., PUGKAEW, W., KUNGVANSAICHOL, K., KRUATRACHUE, M. & DAMRONGPHOL, P. (2012). Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, 89(1), 296-302.

CHATSUNGNOEN, T., & CHISTI, Y. (2016a). Oil production by six microalgae: impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. *Journal of Applied Phycology*, 28(5), 2697-2705.

CHATSUNGNOEN, T., & CHISTI, Y. (2016b). Optimization of oil extraction from *Nannochloropsis salina* biomass paste. *Algal Research*, 15, 100–109.

CHEN, I. S., SHEN, C. S. J., & SHEPPARD, A. J. (1981). Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(5), 599-601.

CHEN, J. L., PROTEAU, P. J., ROBERTS, M. A., GERWICK, W. H., SLATE, D. L., & LEE, R. H. (1994). Structure of malhamensilipin A, an inhibitor of protein tyrosine kinase, from the cultured chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. *Journal of natural products*, 57(4), 524-527.

CHEN, J., LENG, L., YE, C., LU, Q., ADDY, M., WANG, J., LIU, J., CHEN, P., RUAN, P. & ZHOU, W. (2018). A comparative study between fungal pellet-and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. *Bioresource technology*, 259, 181-190.

CHEN, L., LIU, T., ZHANG, W., CHEN, X., & WANG, J. (2012). Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource Technology*, 111, 208-214.

CHEN, S. J., KUAN, I. C., TU, Y. F., LEE, S. L., & YU, C. Y. (2020). Surfactant-assisted in situ transesterification of wet *Rhodotorula glutinis* biomass. *Journal of bioscience and bioengineering*, 130(4), 397-401.

CHENG, J., MIAO, Y., GUO, W., SONG, Y., TIAN, J., & ZHOU, J. (2018). Reduced generation time and size of carbon dioxide bubbles in a volute aerator for improving *Spirulina* sp. growth. *Bioresource technology*, 270, 352-358.

CHINNASAMY, S., RAMAKRISHNAN, B., BHATNAGAR, A., & DAS, K. C. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International journal of molecular sciences*, 10(2), 518-532.

CHISTI, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.

CHO, K., KASAOKA, T., UENO, M., BASTI, L., YAMASAKI, Y., KIM, D., & ODA, T. (2017). Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. *European Journal of Phycology*, 52(3), 311-319.

CHRISTENSON, L., & SIMS, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, 29(6), 686-702.

CHRISTIE, W. W. (1989). Gas chromatography and lipids: A practical guide. *The Oily Press*, Ayr, Scotland.

CHRISTIE, W. W., & HAN, X. (2010). Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis. *UK: Oily Press, Bridgwater*.

- COATES, M. E. & FORD, J. E. (1955). Methods of measurement of vitamin B12, *Biochem. Soc. Symp.*, (13), 36-51.
- COSTARD, G. S., MACHADO, R. R., BARBARINO, E., MARTINO, R. C., & LOURENÇO, S. O. (2012). Chemical composition of five marine microalgae that occur on the Brazilian coast. *Int. J. Fish. Aquacult.*, 4(9), 191-201.
- CROFT, M. T., WARREN, M. J., & SMITH, A. G. (2006). Algae need their vitamins. *Eukaryotic cell*, 5(8), 1175-1183.
- CYSEWSKI, G.R.; LORENZ, R.T. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential: *Haematococcus*. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: *Blackwell Science*, .281-288.
- D'OCA, M. G. M., VIÊGAS, C. V., LEMOES, J. S., MIYASAKI, E. K., MORÓN-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., & ABREU, P. C. (2011). Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *biomass and bioenergy*, 35(4), 1533-1538.
- DANESHVAR, E., OK, Y. S., TAVAKOLI, S., SARKAR, B., SHAHEEN, S. M., HONG, H., LUO, Y., RINKLEBE, J., SONG, H., BHATNAGAR, A. & BHATNAGAR, A. (2021). Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 124870.
- DANESHVAR, E., ZARRINMEHR, M. J., KOUSHA, M., & BHATNAGAR, A. (2020). Performance evaluation of different harvesting methods and cultivation media on the harvesting efficiency of microalga and their fatty acids profile. *Fuel*, 280, 118592.
- DANESI, E. D. G., RANGEL-YAGUI, C. O., CARVALHO, J. C. M., & SATO, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 329-335.
- DE JESUS, S. S., FERREIRA, G. F., MOREIRA, L. S., MACIEL, M. R. W., & MACIEL FILHO, R. (2019). Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. *Renewable Energy*, 143, 130-141.

- DE VREE, J. H., BOSMA, R., JANSSEN, M., BARBOSA, M. J., & WIJFFELS, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 1-12.
- DEMIRBAS, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy conversion and management*, 51(12), 2738-2749.
- DEY, P. M., & KAUSS, H. (1981). α -galactosidase of *Poteroochromonas malhamensis*. *Phytochemistry*, 20(1), 45-48.
- DING, W., JIN, W., ZHOU, X., LI, S. F., TU, R., HAN, S. F., CHEN, C., FENG, X. & HUANG, Y. (2020). Enhanced lipid extraction from the biodiesel-producing microalga *Chlorella pyrenoidosa* cultivated in municipal wastewater via *Daphnia* ingestion and digestion. *Bioresource technology*, 306, 123162.
- DO NASCIMENTO, M., ORTIZ-MARQUEZ, J. C. F., SANCHEZ-RIZZA, L., ECHARTE, M. M., & CURATTI, L. (2012). Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South–Eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresource technology*, 125, 283-290.
- DONG, T., WANG, J., MIAO, C., ZHENG, Y., & CHEN, S. (2013). Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. *Bioresource Technology*, 136, 8-15.
- DU, Y., SCHUUR, B., KERSTEN, S. R., & BRILMAN, D. W. (2015). Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: An energy evaluation. *Algal research*, 11, 271-283.
- EHIMEN, E. A., SUN, Z. F., & CARRINGTON, C. G. (2010). Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89(3), 677-684.
- ELRAYIES, G.M. (2018). Microalgae: prospects for greener future buildings. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 81, 1175–1191.
- ENAMALA, M.K., ENAMALA, S., CHAVALI, M., DONEPUDI, J., YADAVALLI, R., KOLAPALLI, B., ARADHYULA, T.V., VELPURI, J., KUPPAM, C. (2018). Production of biofuels from microalgae-A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and

numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 94, 49–68.

EPSTRIN, E., & BLOOM, A. J. (2006). Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina. *Planta*. 403p.

ESCOBAR, J. C., LORA, E. S., VENTURINI, O. J., YÁÑEZ, E. E., CASTILLO, E. F., & ALMAZAN, O. (2009). Biofuels: environment, technology and food security. *Renewable and sustainable energy reviews*. 13(6), 1275-1287.

ESTEVES, F. A. (1998) Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: *Inteligência*.

FAJARDO, A. R., CERDAN, L. E., MEDINA, A. R., FERNÁNDEZ, F. G. A., MORENO, P. A. G., & GRIMA, E. M. (2007). Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(2), 120-126.

FAKHRY, E. M.; & EL MAGHRABY, D. M. (2015) Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*. (56).

FALKOWSKI, P. G., & RAVEN, J. A. (2013). Aquatic photosynthesis. *Princeton University Press*.

FASAEI, F., BITTER, J.H., SLEGGERS, P.M., VAN BOXTEL, A.J.B. (2018) Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Res*. (31), 347–362.

FAST, A.; BOYD, C. (1992). Water circulation, aeration and other management practices. In: FAST, A.; LESTER, J. Marine shrimp culture: principles and practices. Amsterdam: *Elsevier Science Publishers*, 457-495.

FIELD, C. B., BEHRENFELD, M. J., RANDERSON, J. T., & FALKOWSKI, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *science*, 281(5374), 237-240.

FOLCH, J., LEES, M., & STANLEY, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.

FRANCO, A. L. C., LÔBO, I. P., CRUZ, R. S. D., TEIXEIRA, C. M. L. L., ALMEIDA NETO, J. A. D., & MENEZES, R. S. (2013). Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova*, 36(3), 437-448.

FREEMAN ROSENZWEIG, E. S., XU, B., CUELLAR, L. K., MARTINEZ-SANCHEZ, A., SCHAFFER, M., STRAUSS, M., CARTWRIGHT, H. N., RONCERAY, P., PLITZKO, J. M., FÖRSTER, F., WINGREEN, N. S., ENGEL, B. D., MACKINDER, L.C.M. & JONIKAS, M. C. (2017). The eukaryotic CO₂-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization. *Cell*, 171(1), 148-162.

GALLAGHER, BJ (2011). A economia da produção de biodiesel a partir de algas. *Energia renovável*, 36 (1), 158-162.

GAO, K., ORR, V., & REHMANN, L. (2016). Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction. *Bioresource technology*, 206, 77-85.

GAROMA, T., & JANDA, D. (2016). Investigation of the effects of microalgal cell concentration and electroporation, microwave and ultrasonication on lipid extraction efficiency. *Renewable energy*, 86, 117-123.

GHASEMI, Y., RASOUL-AMINI, S., NASERI, A. T., MONTAZERI-NAJAFABADY, N., MOBASHER, M. A., & DABBAGH, F. (2012). Microalgae biofuel potentials. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 126-144.

GHOSH, S., BANERJEE, S., & DAS, D. (2017). Process intensification of biodiesel production from *Chlorella* sp. MJ 11/11 by single step transesterification. *Algal Research*, 27, 12-20.

GILL, I., & VALIVETY, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends in biotechnology*, 15(10), 401-409.

GONÇALVES, A. L., PIRES, J. C., & SIMÕES, M. (2013). Lipid production of *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4(1), 1-6.

GONÇALVES, V. D., FAGUNDES-KLEN, M. R., TRIGUEROS, D. E. G., KROUMOV, A. D., & MÓDENES, A. N. (2019a). Statistical and optimization strategies to carotenoids production by *Tetrademus acuminatus* (LC192133. 1) cultivated in photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 152, 107351.

GONÇALVES, V. D., FAGUNDES-KLEN, M. R., TRIGUEROS, D. E. G., SCHUELTER, A. R., KROUMOV, A. D., & MÓDENES, A. N. (2019b). Combination of Light Emitting Diodes (LEDs) for photostimulation of carotenoids and chlorophylls synthesis in *Tetrademus* sp. *Algal Research*, 43, 101649.

GONG, Y., & HUANG, J. (2020). Characterization of four untapped microalgae for the production of lipids and carotenoids. *Algal Research*, 49, 101897.

GONZÁLEZ, E. G., DE CARVALHO, J. C., AULESTIA, D. T. M., GONZALEZ, O. I. M., & SOCCOL, C. R. (2020). Bioprospection of green microalgae native to Paraná, Brazil using a multi-criteria analysis: Potential for the production of lipids, proteins, and carotenoids. *Bioresource Technology Reports*, 10, 100398.

GREENLY, J. M., & TESTER, J. W. (2015). Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 276-279.

GREENWELL, H. C., LAURENS, L. M. L., SHIELDS, R. J., LOVITT, R. W., & FLYNN, K. J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the royal society interface*, 7(46), 703-726.

GRIMA, E. M., BELARBI, E. H., FERNÁNDEZ, F. A., MEDINA, A. R., & CHISTI, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology advances*, 20(7-8), 491-515.

GROBBELAAR, J. U. (2013). Inorganic algal nutrition. *Handbook of microalgal culture*, 123-133.

GUALTIERI, P., & BARSANTI, L. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*.

GULDHE, A., SINGH, B., RAWAT, I., & BUX, F. (2014). Synthesis of biodiesel from *Scenedesmus* sp. by microwave and ultrasound assisted in situ transesterification using tungstated zirconia as a solid acid catalyst. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(8), 1503-1511.

GUO, S., WANG, P., WANG, X., ZOU, M., LIU, C., & HAO, J. (2020). Microalgae as Biofertilizer in Modern Agriculture. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer, 397-411.

GUO, X., YAO, L., & HUANG, Q. (2015). Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae. *Bioresource technology*, 190, 189-195.

GUPTA, S. K., ANSARI, F. A., BAUDDH, K., SINGH, B., NEMA, A. K., & PANT, K. K. (2017). Harvesting of microalgae for biofuels: comprehensive performance evaluation of natural, inorganic, and synthetic flocculants. In *Green technologies and environmental sustainability*. Springer, 131-156.

HAJRA, A. K. (1974). On extraction of acyl and alkyl dihydroxyacetone phosphate from incubation mixtures. *Lipids*, 9(8), 502-505.

HALEVY, S.&L. AVIVI, (1968). Isolation of hemolysins from *Ochromonas* spp., *Pymnesium parvum* and *Trypanosoma ranarum*. *J. Protozool.* 15 (Suppl.): 45.

HALIM, R., DANQUAH, M. K., & WEBLEY, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances*, 30(3), 709-732.

HALIM, R., GLADMAN, B., DANQUAH, M. K., & WEBLEY, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource technology*, 102(1), 178-185.

HAN, F., PEI, H., HU, W., SONG, M., MA, G., & PEI, R. (2015a). Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state. *Energy Conversion and Management*, 90, 315-322.

HAN, L., PEI, H., HU, W., JIANG, L., MA, G., ZHANG, S., & HAN, F. (2015b). Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. *Bioresource technology*, *175*, 262-268.

HAN, X., SONG, X., LI, F., & LU, Y. (2020). Improving lipid productivity by engineering a control-knob gene in the oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Metabolic engineering communications*, *11*, e00142.

HANSEN, J. A. (1973). Antibiotic activity of the chrysophyte *Ochromonas malhamensis*. *Physiologia Plantarum*, *29*(2), 234-238.

HARA, A., & RADIN, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical biochemistry*, *90*(1), 420-426.

HARTMAN, L. & LAGO, R. C. A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, *22*, 475-476.

HINTERHOLZ, C. L., TRIGUEROS, D. E. G., MÓDENES, A. N., BORBA, C. E., SCHEUFELE, F. B., SCHUELTER, A. R., & KROUMOV, A. D. (2019). Computational fluid dynamics applied for the improvement of a flat-plate photobioreactor towards high-density microalgae cultures. *Biochemical Engineering Journal*, *151*, 107257.

HUTCHINSON, G. E. (1961). The paradox of the plankton. *The American Naturalist*, *95*(882), 137-145.

ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., & SHALES, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, *27*(8), 631-635.

JAFARI, A., ESMAEILZADEH, F., MOWLA, D., SADATSHOJAEI, E., HEIDARI, S., & WOOD, D. A. (2021). New insights to direct conversion of wet microalgae impregnated with ethanol to biodiesel exploiting extraction with supercritical carbon dioxide. *Fuel*, *285*, 119199.

JAMES, C. M., AL-HINTY, S., & SALMAN, A. E. (1989). Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, *77*(4), 337-351.

- JAPAR, A. S., TAKRIFF, M. S., & YASIN, N. H. M. (2017). Harvesting microalgal biomass and lipid extraction for potential biofuel production: A review. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(1), 555-563.
- JAYAKUMAR, S., BHUYAR, P., PUGAZHENDHI, A., RAHIM, M. H. A., MANIAM, G. P., & GOVINDAN, N. (2021). Effects of light intensity and nutrients on the lipid content of marine microalga (diatom) *Amphiprora* sp. for promising biodiesel production. *Science of The Total Environment*, 768, 145471.
- JENSEN, S. K. (2008). Improved Bligh and Dyer extraction procedure. *Lipid Technology*, 20(12), 280-281.
- JI, Y., HU, W., LI, X., MA, G., SONG, M., & PEI, H. (2014). Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. *Bioresource technology*, 152, 471-476.
- JOHNSON, M. B., & WEN, Z. (2009). Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy & Fuels*, 23(10), 5179-5183.
- JUNG, S., RICKERT, D. A., DEAK, N. A., ALDIN, E. D., RECKNOR, J., JOHNSON, L. A., & MURPHY, P. A. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1169.
- KAGEYAMA, H., & WADITEE-SIRISATTHA, R. (2018). Mycosporine-like amino acids as multifunctional secondary metabolites in cyanobacteria: From biochemical to application aspects. *Studies in natural products chemistry*, 59, 153-194.
- KARPAGAM, R., JAWAHARRAJ, K., & GNANAM, R. (2021). Review on integrated biofuel production from microalgal biomass through the outset of transesterification route: a cascade approach for sustainable bioenergy. *Science of The Total Environment*, 766, 144236.
- KERBY, N. W., & STEWART, W. D. P. (1988). The biotechnology of microalgae and cyanobacteria. *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*, 326-27.

KETCHUM, B. H. (1954). Mineral nutrition of phytoplankton. *Annual Review of Plant Physiology*, 5(1), 55-74.

KHERJEE, S. S., MUTHAPPA, R., MATHIMANI, T., DEVIRAM, G., KUMAR, S. S., VERMA, T. N. & PUGAZHENDHI, A. (2020). Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*, 242, 125079.

KIM, B., IM, H., & LEE, J. W. (2015). In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. *Bioresource technology*, 185, 421-425.

KIM, K., SHIN, H., MOON, M., RYU, B. G., HAN, J. I., YANG, J. W., & CHANG, Y. K. (2015). Evaluation of various harvesting methods for high-density microalgae, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Bioresource technology*, 198, 828-835.

KIRK, J. T. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press, 509.

KLEIN, B. C., BONOMI, A., & MACIEL FILHO, R. (2018). Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1376-1392.

KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J., MALCATA, F. X. & VAN LANGENHOVE, H. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in biotechnology*, 28(7), 371-380.

KWIETNIEWSKA, E., TYS, J., KRZEMINSKA, I., & KOZIEL, W. (2012). Microalgae-cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. *Acta Agrophysica. Monographiae*, (2).

LAAMANEN, C. A., ROSS, G. M., & SCOTT, J. A. (2016). Flotation harvesting of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 75-86.

LAURENS, L. M., QUINN, M., VAN WYCHEN, S., TEMPLETON, D. W., & WOLFRUM, E. J. (2012). Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(1), 167-178.

- LAVANYA, M., MEENAKSHISUNDARAM, A., RENGANATHAN, S., CHINNASAMY, S., LEWIS, D. M., NALLASIVAM, J., & BHASKAR, S. (2016). Hydrothermal liquefaction of freshwater and marine algal biomass: a novel approach to produce distillate fuel fractions through blending and co-processing of biocrude with petrocrude. *Bioresource technology*, 203, 228-235.
- LEE, R. E. (2008). *Phycology*. 4th Edition, Cambridge, 547.
- LEE, S. J., GO, S., JEONG, G. T., & KIM, S. K. (2011). Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 16(3), 561-566.
- LEE, S. J., YOON, B. D., & OH, H. M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology techniques*, 12(7), 553-556.
- LEEPER, D. A., & PORTER, K. G. (1995). Toxicity of the mixotrophic chrysophyte *Poteroiochromonas malhamensis* to the cladoceran *Daphnia ambigua*. *Archiv für Hydrobiologie*, 134(2), 207-222.
- LEWIS, T., NICHOLS, P. D., & MCMEEKIN, T. A. (2000). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 107-116.
- LI, P., MIAO, X., LI, R., & ZHONG, J. (2011). In situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-9.
- LI, X., XU, H., & WU, Q. (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 98(4), 764-771.
- LI, Y., HORSMAN, M., WU, N., LAN, C. Q., & DUBOIS-CALERO, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology progress*, 24(4), 815-820.
- LICHTENTHALER, H. K., & BUSCHMANN, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1), F4-3.

- LIEW, W. H., HASSIM, M. H., & NG, D. K. (2014). Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. *Journal of Cleaner Production*, 71, 11-29.
- LIU, J., YUAN, C., HU, G., & LI, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(8), 2127-2137.
- LIU, N., GUO, B., CAO, Y., WANG, H., YANG, S., HUO, H., KONG, W., ZHANG, A. & NIU, S. (2021). Effects of organic carbon sources on the biomass and lipid production by the novel microalga *Micractinium reisseri* FM1 under batch and fed-batch cultivation. *South African Journal of Botany*, 139, 329-337.
- LOURENÇO, S. O. (2006). *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. 606. São Carlos: RiMa.
- LUBIANA, K. M. F. (2014) Microalgas: ecologia, biodiversidade e importância. *IV Botânica no Inverno* Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 192
- LUI, N. S., ROELS, O. A., TROUT, M. E., & ANDERSON, O. R. (1968). Subcellular distribution of enzymes in *Ochromonas malhamensis*. *The Journal of protozoology*, 15(3), 536-542.
- LUTZ, A. (1985). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, (3), 98.
- MA, M., GONG, Y., & HU, Q. (2018). Identification and feeding characteristics of the mixotrophic flagellate *Poterioochromonas malhamensis*, a microalgal predator isolated from outdoor massive *Chlorella* culture. *Algal research*, 29, 142-153.
- MA, X., LIU, F., HELIAN, Y., LI, C., WU, Z., LI, H., CHU, H., WANG, Y., WANG, Y. LU, W., GUO, M., YU, M., & ZHOU, S. (2021). Current application of MOFs based heterogeneous catalysts in catalyzing transesterification/esterification for biodiesel production: A review. *Energy Conversion and Management*, 229, 113760.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D., MANTELL, C., RODRIGUEZ, M. D. L., DE LA OSSA, E. M., LUBIÁN, L. M., & MONTERO, O. (2009). Comparison of supercritical fluid and

ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77(3), 948-952.

MAHBOOB, S., RAUF, A., ASHRAF, M., SULTANA, T., SULTANA, S., JABEEN, F., RAJOKA, M. I., AL-BALAWI, H. F. A. & AL-GHANIM, K. A. (2012). High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture international*, 20(3), 455-466.

MANDIK, Y. I., CHEIRSILP, B., SRINUANPAN, S., MANEECHOTE, W., BOONSAWANG, P., PRASERTSAN, P., & SIRISANSANEYAKUL, S. (2020). Zero-waste biorefinery of oleaginous microalgae as promising sources of biofuels and biochemicals through direct transesterification and acid hydrolysis. *Process Biochemistry*, 95, 214-222.

MARGALITH, P. Z. (1999). Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(4), 431-438.

MARKEB, A. A., LLIMÓS-TURET, J., FERRER, I., BLÁNQUEZ, P., ALONSO, A., SÁNCHEZ, A., MORAL-VICO, J. & FONT, X. (2019). The use of magnetic iron oxide based nanoparticles to improve microalgae harvesting in real wastewater. *Water research*, 159, 490-500.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., & CAETANO, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.

MATHIMANI, T., & MALLICK, N. (2018). A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel—key challenges and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 1103-1120.

MATOS, Â. P., FELLER, R., MOECKE, E. H. S., DE OLIVEIRA, J. V., JUNIOR, A. F., DERNER, R. B., & SANT'ANNA, E. S. (2016). Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93, 963-972.

MCKENRIE, C. H., DEIBEL, D., PARANJAPE, M. A., & THOMPSON, R. J. (1995). THE MARINE MIXOTROPH DINOBYON *BALTICUM* (CHRYSOPHYCEAE):

PHAGOTROPHY AND SURVIVAL IN A COLD OCEAN 1. *Journal of Phycology*, 31(1), 19-24.

MCNICHOL, J., MACDOUGALL, K. M., MELANSON, J. E., & MCGINN, P. J. (2012). Suitability of soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification. *Lipids*, 47(2), 195-207.

MEDINA, A. R., GRIMA, E. M., GIMÉNEZ, A. G., & GONZÁLEZ, M. I. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology advances*, 16(3), 517-580.

MENDES, R. L., FERNANDES, H. L., COELHO, J., REIS, E. C., CABRAL, J. M., NOVAIS, J. M., & PALAVRA, A. F. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food chemistry*, 53(1), 99-103.

MENEGAZZO, M. L., & FONSECA, G. G. (2019). Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 87-107.

MENEGHETTI, S. P., MENEGHETTI, M. R., & BRITO, Y. C. (2013). A reação de transesterificação, algumas aplicações e obtenção de biodiesel. *Revista Virtual de Química*, 5(1), 63-73.

MEZZOMO, N., SAGGIORATO, A. G., SIEBERT, R., TATSCH, P. O., LAGO, M. C., HEMKEMEIER, M., COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E. & COLLA, L. M. (2010). Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Food Science and Technology*, 30(1), 173-178.

MILANO, J., ONG, H. C., MASJUKI, H. H., CHONG, W. T., LAM, M. K., LOH, P. K., & VELLAYAN, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180-197.

MILLEDGE, J. J., & HEAVEN, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 165-178.

- MOHSENPOUR, S. F., & WILLOUGHBY, N. (2016). Effect of CO₂ aeration on cultivation of microalgae in luminescent photobioreactors. *Biomass and Bioenergy*, 85, 168-177.
- MORAIS, M. G. D., & COSTA, J. A. V. (2008). Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por micro-algas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova*, 31(5), 1038-1042.
- MORAIS, M. G., & COSTA, J. A. V. (2007). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology*, 129(3), 439-445.
- MORALES-SÁNCHEZ, D., SCHULZE, P. S., KIRON, V., & WIJFFELS, R. H. (2020). Production of carbohydrates, lipids and polyunsaturated fatty acids (PUFA) by the polar marine microalga *Chlamydomonas malina* RCC2488. *Algal Research*, 50, 102016.
- MORCELLI, A., CASSEL, E., VARGAS, R., RECH, R., & MARCÍLIO, N. (2021). Supercritical fluid (CO₂+ ethanol) extraction of chlorophylls and carotenoids from *Chlorella sorokiniana*: COSMO-SAC assisted prediction of properties and experimental approach. *Journal of CO₂ Utilization*, 51, 101649.
- MORENO-GARCIA, L., ADJALLÉ, K., BARNABÉ, S., & RAGHAVAN, G. S. V. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 493-506.
- MORTENSEN, S. H., BØRSHEIM, K. Y., RAINUZZO, J., & KNUTSEN, G. (1988). Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 122(2), 173-185.
- MUBARAK, M., SHAIJA, A., & SUCHITHRA, T. V. (2015). A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, 7, 117-123.
- MUSTAFA, M.G., KHAN, M.G.M., NGUYEN, D., IQBAL, S. (2018). Techniques in Biotechnology: Essential for Industry. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. 233–249.

- NASCIMENTO, I. A., MARQUES, S. S. I., CABANELAS, I. T. D., PEREIRA, S. A., DRUZIAN, J. I., DE SOUZA, C. O., VICH, D. V., CARVALHO, G. O. & NASCIMENTO, M. A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy research*, 6(1), 1-13.
- NAUTIYAL, P., SUBRAMANIAN, K. A., & DASTIDAR, M. G. (2014). Kinetic and thermodynamic studies on biodiesel production from *Spirulina platensis* algae biomass using single stage extraction–transesterification process. *Fuel*, 135, 228-234.
- NAYAK, S. N., BHASIN, C. P., & NAYAK, M. G. (2019). A review on microwave-assisted transesterification processes using various catalytic and non-catalytic systems. *Renewable Energy*, 143, 1366-1387.
- NELSON, D. L., & COX, M. M. (2014). Princípios de Bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: *Artmed*, (6)
- NIE, C., PEI, H., JIANG, L., CHENG, J., & HAN, F. (2018). Growth of large-cell and easily-sedimentation microalgae *Golenkinia SDEC-16* for biofuel production and campus sewage treatment. *Renewable Energy*, 122, 517-525.
- NIGAM, P. S., & SINGH, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in energy and combustion science*, 37(1), 52-68.
- OGBONNA, J. C., & TANAKA, H. (1996). Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6), 558-564.
- OHSE, S., DERNER, R. B., OZÓRIO, R. Á., CUNHA, P. C. R., LAMARCA, C. P., DOS SANTOS, M. E., & MENDES, L. B. B. (2007). Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. *INSULA Revista de Botânica*, 36, 39.
- OLAIZOLA, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, 20(4-6), 459-466.

- OLIVEIRA, A. C. D. (2013). Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais: Setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- OLIVEIRA, M. A. C. L., MONTEIRO, M. P. C., ROBBS, P. G., & LEITE, S. G. F. (1999). Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture international*, 7(4), 261-275.
- OOMS, M. D., DINH, C. T., SARGENT, E. H., & SINTON, D. (2016). Photon management for augmented photosynthesis. *Nature Communications*, 7(1), 1-13.
- OROSA, M., TORRES, E., FIDALGO, P., & ABALDE, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 553-556.
- OTT, K. O. (1995). Global warming and the greenhouse effect. *Progress in Nuclear Energy*, 29, 81-88.
- PAHL, S. L., LEE, A. K., KALAITZIDIS, T., ASHMAN, P. J., SATHE, S., & LEWIS, D. M. (2013). Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. In *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht. 165-185.
- PAN, C. G., PENG, F. J., & YING, G. G. (2018). Removal, biotransformation and toxicity variations of climbazole by freshwater algae *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Pollution*, 240, 534-540.
- PARK, J. Y., KIM, M. C., CHENG, J., YANG, W., & KIM, D. K. (2020). Extraction of microalgal oil from *Nannochloropsis oceanica* by potassium hydroxide-assisted solvent extraction for heterogeneous transesterification. *Renewable Energy*, 162, 2056-2065.
- PELCZAR JUNIOR, M. J., CHAN, E. C., KRIEG, N., EDWARDS, D. D., & PELCZAR, M. (1996). Microbiologia: conceitos e aplicações. In *Microbiologia: conceitos e aplicações* (pp. 524-524).
- PEREIRA, C. M. P., HOBUSS, C. B., MACIEL, J. V., FERREIRA, L. R., DEL PINO, F. B., MESKO, M. F., JACOB-LOPES, E. & NETO, P. C. (2012). Renewable biodiesel derived from microalgae: advances and technological perspectives. *New Chemistry*, 35(10), 2013-2018.

- PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M., DE-BASHAN, L. E., & BASHAN, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- PIRES, J. C. (2017). COP21: the algae opportunity?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 867-877.
- POHNDORF, R. S., CAMARA, Á. S., LARROSA, A. P., PINHEIRO, C. P., STRIEDER, M. M., & PINTO, L. A. (2016). Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. *Biomass and bioenergy*, 93, 25-32.
- POLAT, E., YÜKSEL, E., & ALTINBAŞ, M. (2020). Mutual effect of sodium and magnesium on the cultivation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides*. *Biomass and Bioenergy*, 132, 105441.
- PRAGYA, N., PANDEY, K. K., & SAHOO, P. K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.
- PRINGSHEIM, E. G. (1952). On the nutrition of *Ochromonas*. *Journal of Cell Science*, 3(21), 71-96.
- PROCHÁZKOVÁ, G., BRÁNYIKOVÁ, I., ZACHLEDER, V., & BRÁNYIK, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1359-1377.
- PROVASOLI, L. (1958). Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Annual review of microbiology*, 12(1), 279-308.
- PULZ, O., & GROSS, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), 635-648.
- QIU, R., GAO, S., LOPEZ, P. A., & OGDEN, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal research*, 28, 192-199.

RADAKOVITS, R., JINKERSON, R. E., DARZINS, A., & POSEWITZ, M. C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic cell*, 9(4), 486-501.

RADMER, R., BEHRENS, P., & ARNETT, K. (1987). Analysis of the productivity of a continuous algal culture system. *Biotechnology and bioengineering*, 29(4), 488-492.

RAMOS, L. P., KOTHE, V., CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F., MUNIZ-WYPYCH, A. S., NAKAGAKI, S., KRIEGER, N., WYOYCH, F. & CORDEIRO, C. S. (2017). Biodiesel: matérias-primas, tecnologias de produção e propriedades combustíveis. *Revista virtual de química*, 9(1), 317-369.

RANJAN, A., PATIL, C., & MOHOLKAR, V. S. (2010). Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(6), 2979–2985.

RAS, M., STEYER, J. P., & BERNARD, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 153-164.

RATHNAM, V. M., MODAK, J. M., & MADRAS, G. (2020). Non-catalytic transesterification of dry microalgae to fatty acid ethyl esters using supercritical ethanol and ethyl acetate. *Fuel*, 275, 117998.

RAVEN, J. A. (1990). Sensing pH?. *Plant, Cell & Environment*, 13(7), 721-729.

RAVEN, J. A., & GEIDER, R. J. (1988). Temperature and algal growth. *New phytologist*, 110(4), 441-461.

RAWAT, I., KUMAR, R. R., MUTANDA, T., & BUX, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.

REAZIN JR, G. H. (1954). On the dark metabolism of a golden-brown alga, *Ochromonas malhamensis*. *American Journal of Botany*, 771-777.

- REBOLLOSO FUENTES, M., FERNÁNDEZ, G. A., PÉREZ, J. S., & GUERRERO, J. G. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345-353.
- REICH, K., & SPIEGELSTEIN, M. (1964). Fishtoxins in *Ochromonas* (chrysomonadina). *Israel Journal of Zoology*, 13(3), 141-141.
- RENAUD, S. M., THINH, L. V., LAMBRINIDIS, G., & PARRY, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211(1-4), 195-214.
- RENAUD, S. M., ZHOU, H. C., PARRY, D. L., THINH, L. V., & WOO, K. C. (1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T. ISO). *Journal of Applied Phycology*, 7(6), 595-602.
- RICHMOND, A. (1990). Outdoor mass cultures of microalgae: biological principles, production systems. In *CRC Press* 285-330.
- RICHMOND, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. CRC Press.
- RITCHIE, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis research*, 89(1), 27-41.
- ROCHA, J. M., GARCIA, J. E., & HENRIQUES, M. H. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular engineering*, 20(4-6), 237-242.
- RÖDERER, G. (1986). *Poterioochromonas malhamensis*—a unicellular alga as test system in ecotoxicology, toxicology, and pharmacology. *Toxicity assessment*, 1(1), 123-138.
- ROSIC, N. N. (2019). Mycosporine-like amino acids: making the foundation for organic personalised sunscreens. *Marine drugs*, 17(11), 638.
- RUBIO, F. C., CAMACHO, F. G., SEVILLA, J. F., CHISTI, Y., & GRIMA, E. M. (2003). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology and bioengineering*, 81(4), 459-473.

SAHOO, N. K., GUPTA, S. K., RAWAT, I., ANSARI, F. A., SINGH, P., NAIK, S. N., & BUX, F. (2017). Sustainable dewatering and drying of self-flocculating microalgae and study of cake properties. *Journal of cleaner production*, 159, 248-256.

SAJJADI, B., CHEN, W. Y., RAMAN, A. A. A., & IBRAHIM, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200-232.

SALAM, K. A., VELASQUEZ-ORTA, S. B., & HARVEY, A. P. (2016). A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-product-a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 1179-1198.

SÁNCHEZ-BAYO, A., LÓPEZ-CHICCHARRO, D., MORALES, V., ESPADA, J. J., PUYOL, D., MARTÍNEZ, F., ASTALS, S., VICENTE, G., BAUTISTA, L. F. & RODRÍGUEZ, R. (2020). Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: a biorefinery approach. *Renewable energy*, 146, 188-195.

SANDERS, R. W., PORTER, K. G., & CARON, D. A. (1990). Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poteroochromonas malhamensis*. *Microbial Ecology*, 19(1), 97-109.

SARKAR, S., MANNA, M. S., BHOWMICK, T. K., & GAYEN, K. (2020). Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella Thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. *Process Biochemistry*, 96, 58-72.

SATI, H., MITRA, M., MISHRA, S., & BARENDAR, P. (2019). Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. *Algal research*, 38, 101413.

SCHMIDT, C. W. (2007). Biodiesel: cultivating alternative fuels. *Environmental Health Perspect*, 115(2), 86-91.

SCHMITZ, R., MAGRO, C. D., & COLLA, L. M. (2012). Aplicações ambientais de microalgas. *Revista CIATEC-UPF*, 4(1), 48-60.

SCHNURR, P. J., & ALLEN, D. G. (2015). Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 418-429.

SCHOBERT, B., UNTNER, E., & KAUSS, H. (1972). Isofloridosid und die Osmoregulation bei *Ochromonas malhamensis*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 67(5), 385-398.

SCHUELTER, A. R., KROUMOV, A. D., HINTERHOLZ, C. L., FIORINI, A., TRIGUEROS, D. E. G., VENDRUSCOLO, E. G., ZAHARIEVA, M., MÓDENES, A. N. (2019). Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 144, 28-39.

SCHULZE, P. S., BARREIRA, L. A., PEREIRA, H. G., PERALES, J. A., & VARELA, J. C. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in biotechnology*, 32(8), 422-430.

SHAHZAD, I., HUSSAIN, K., NAWAZ, K., NISAR, M. F., & BHATTI, K. H. (2010). Algae as an alternative and renewable resource for biofuel production. *The boil (Ejournal for life sciences)*, 1(1), 16-32.

SHARMA, H. K., XU, C., & QIN, W. (2019). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235-251.

SHELEF, G., SUKENIK, A., & GREEN, M. (1984). Microalgae harvesting and processing: a literature review.

SHIRAIWA, Y., GOYAL, A., & TOLBERT, N. E. (1993). Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake dissolved inorganic carbon. *Plant and cell physiology*, 34(5), 649-657.

SHOW, K. Y., LEE, D. J., & CHANG, J. S. (2013). Algal biomass dehydration. *Bioresource technology*, 135, 720-729.

SHOW, P. L., TANG, M. S., NAGARAJAN, D., LING, T. C., OOI, C. W., & CHANG, J. S. (2017). A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 215.

SHRIKANT, B. R., & MADAAN, S. (2021). Cultivation and potential application of microalgae in treatment of Pesticide Manufacturing Effluent. *Materials Today: Proceedings*, 43, 1944-1948.

SRIVASTAVA, A., KALWANI, M., CHAKDAR, H., PABBI, S., & SHUKLA, P. (2022). Biosynthesis and biotechnological interventions for commercial production of microalgal pigments: A review. *Bioresource Technology*, 352, 127071.

SILVA, R. P., ROCHA-SANTOS, T. A., & DUARTE, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.

SILVE, A., PAPACHRISTOU, I., WÜSTNER, R., STRÄßNER, R., SCHIRMER, M., LEBER, K., GUO, B., INTERRANTE, L., POSTEN, C. & FREY, W. (2018). Extraction of lipids from wet microalga *Auxenochlorella protothecoides* using pulsed electric field treatment and ethanol-hexane blends. *Algal research*, 29, 212-222.

SIMOPOULOS, A.P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.

SINGH, J., & SAXENA, R. C. (2015). An introduction to microalgae: diversity and significance. In *Handbook of marine microalgae*. Academic Press, 11-24.

SINGH, R. N., & SHARMA, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347-2353.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., & CROUCH, S. R. (2006). Fundamentos de Química Analítica, 8^a. São Paulo: Cengage Learning.

SKULBERG, O. M. (2004). Bioactive chemicals in microalgae. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 485-512.

SOH, L., & ZIMMERMAN, J. (2011). Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide. *Green Chemistry*, 13(6), 1422-1429.

- SOMAN, A., & SHASTRI, Y. (2015). Optimization of novel photobioreactor design using computational fluid dynamics. *Applied energy*, 140, 246-255.
- SPILLING, K., SEPPÄLÄ, J., & TAMMINEN, T. (2011). Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 959-966.
- SRIVASTAVA, A., & PRASAD, R. (2000). Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and sustainable energy reviews*, 4(2), 111-133.
- STANIER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., & COHEN-BAZIRE, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35(2), 171.
- STIRK, W. A., & VAN STADEN, J. (2020). Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 107612.
- SU, Y., SONG, K., ZHANG, P., SU, Y., CHENG, J., & CHEN, X. (2017). Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 402-411.
- SUALI, E., & SARBATLY, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316-4342.
- SUAREZ, P. A., MENEGHETTI, S. M. P., MENEGHETTI, M. R., & WOLF, C. R. (2007). Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química nova*, 30(3), 667-676.
- SUH, I. S., & LEE, S. B. (2003). A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 82(2), 180-189.
- SUN, H., ZHAO, W., MAO, X., LI, Y., WU, T., & CHEN, F. (2018). High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1-23.
- SUN, Y., ZHANG, N., ZHOU, J., DONG, S., ZHANG, X., GUO, L., & GUO, G. (2020). Distribution, contents, and types of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine

macroalgae and a database for MAAs based on these characteristics. *Marine drugs*, 18(1), 43.

SUSLICK, K. S., & FLANNIGAN, D. J. (2008). Inside a collapsing bubble: sonoluminescence and the conditions during cavitation. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 59, 659-683.

TAHERKHANI, M., & SADRAMELI, S. M. (2018). An improvement and optimization study of biodiesel production from linseed via in-situ transesterification using a co-solvent. *Renewable Energy*, 119, 787-794.

TAN, X. B., LAM, M. K., UEMURA, Y., LIM, J. W., WONG, C. Y., & LEE, K. T. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: a review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 17-30.

TANG, S., QIN, C., WANG, H., LI, S., & TIAN, S. (2011). Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, 57(1), 44-49.

TANG, X., ZHANG, C., LI, Z., & YANG, X. (2016). Element and chemical compounds transfer in bio-crude from hydrothermal liquefaction of microalgae. *Bioresource technology*, 202, 8-14.

TECO-BRAVO, J. I., BARAHONA-PÉREZ, L. F., PERAZA-ECHEVERRIA, S., BAAS-ESPÍNOLA, F. M., REYES-SOSA, C. F., & HERRERA-VALENCIA, V. A. (2021). Lipid profiles of acid-tolerant mutants of the green microalga *Chlorella saccharophila* reveal hydrocarbons and high-value lipids with potential industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 13, 100636.

TEO, S. H., ISLAM, A., & TAUFIQ-YAP, Y. H. (2016). Algae derived biodiesel using nanocatalytic transesterification process. *Chemical engineering research and design*, 111, 362-370.

THANH, N. T., MOSTAPHA, M., LAM, M. K., ISHAK, S., DASAN, Y. K., LIM, J. W., TAN, I. S., LAU, S. Y., CHIN, B. L. S. & HADIBARATA, T. (2022). Fundamental understanding of in-situ transesterification of microalgae biomass to biodiesel: A critical review. *Energy Conversion and Management*, 270, 116212.

THOMPSON, P. A., GUO, M. X., & HARRISON, P. J. (1992). Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28(4), 481-488.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., & CASE, C. L. (2000). Microbiologia. 6ª edição. *Porto Alegre: Artmed*.

TRIPATHI, U., SARADA, R., RAO, S. R., & RAVISHANKAR, G. A. (1999). Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68(2), 197-199.

TRIVEDI, J., AILA, M., BANGWAL, D. P., KAUL, S., & GARG, M. O. (2015). Algae based biorefinery—how to make sense?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295-307.

UDUMAN, N., QI, Y., DANQUAH, M. K., FORDE, G. M., & HOADLEY, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy*, 2(1), 012701.

VAN NIEUWENHUYZEN, W. (2015). Production and Utilization of Natural Phospholipids. *Polar Lipids*, 245-276.

VASIĆ, K., HOJNIK PODREPŠEK, G., KNEZ, Ž., & LEITGEB, M. (2020). Biodiesel production using solid acid catalysts based on metal oxides. *Catalysts*, 10(2), 237.

VASISTHA, S., KHANRA, A., CLIFFORD, M., & RAI, M. P. (2020). Current advances in microalgae harvesting and lipid extraction processes for improved biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 110498.

VIAN, C. E. F., BELIK, W., PAULILLO, L. F., & CORDER, L. M. (2008). *Perspectivas da agroenergia no Brasil* (No. 112702). Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER).

VIEIRA, B. B., SOARES, J., AMORIM, M. L., BITTENCOURT, P. V. Q., DE CÁSSIA SUPERBI, R., DE OLIVEIRA, E. B., COIMBRA, J.S.R. & MARTINS, M. A. (2021). Optimized extraction of neutral carbohydrates, crude lipids and photosynthetic pigments

from the wet biomass of the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. *Separation and Purification Technology*, 269, 118711.

VIJAYARAGHAVAN, K., & HEMANATHAN, K. (2009). Biodiesel production from freshwater algae. *Energy & Fuels*, 23(11), 5448-5453.

WAGNER, I., STEINWEG, C., & POSTEN, C. (2016). Mono-and dichromatic LED illumination leads to enhanced growth and energy conversion for high-efficiency cultivation of microalgae for application in space. *Biotechnology journal*, 11(8), 1060-1071.

WAHIDIN, S., IDRIS, A., & SHALEH, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology*, 129, 7-11.

WANG, T., YANG, W. L., HONG, Y., & HOU, Y. L. (2016). Magnetic nanoparticles grafted with amino-riched dendrimer as magnetic flocculant for efficient harvesting of oleaginous microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 297, 304-314.

WANG, Y., GONG, Y., DAI, L., SOMMERFELD, M., ZHANG, C., & HU, Q. (2018). Identification of harmful protozoa in outdoor cultivation of *Chlorella* and the use of ultrasonication to control contamination. *Algal research*, 31, 298-310.

WHANGCHAI, K., MATHIMANI, T., SEKAR, M., SHANMUGAM, S., BRINDHADEVI, K., VAN HUNG, T., CHINNATHAMBI, A., ALHARBI, S. A. & PUGAZHENDHI, A. (2021). Synergistic supplementation of organic carbon substrates for upgrading neutral lipids and fatty acids contents in microalga. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 105482.

WOESE, C. R., KANDLER, O., & WHEELIS, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.

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

XIN, L., HONG-YING, H., YU-PING, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource technology*, 102(3), 3098-3102.

XU, J., LI, T., LI, C. L., ZHU, S. N., WANG, Z. M., & ZENG, E. Y. (2020). Lipid accumulation and eicosapentaenoic acid distribution in response to nitrogen limitation in microalga *Eustigmatos vischeri* JHsu-01 (Eustigmatophyceae). *Algal Research*, 48, 101910.

YIN, Z., ZHU, L., LI, S., HU, T., CHU, R., MO, F., HU, D., LIU, C., LI, B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource technology*, 301, 122804.

YU, X., CHEN, L., ZHANG, W. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Frontiers in microbiology*, 6, 56.

ZHANG, X., HU, H. Y., HONG, Y., & YANG, J. (2008). Isolation of a *Poterioochromonas* capable of feeding on *Microcystis aeruginosa* and degrading microcystin-LR. *FEMS Microbiology Letters*, 288(2), 241-246.

ZHANG, X., WATANABE, M. M. (2001). Grazing and growth of the mixotrophic chrysomonad *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) feeding on algae. *Journal of Phycology*, 37(5), 738-743.

ZHANG, X., WATANABE, M. M., & INOUE, I. (1996). Light and electron microscopy of grazing by *Poterioochromonas Malhamensis* (chrysophyceae) on a range of phytoplankton taxa 1. *Journal of Phycology*, 32(1), 37-46.

ZHAO, B., ZHANG, Y., XIONG, K., ZHANG, Z., HAO, X., & LIU, T. (2011). Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation. *Chemical engineering research and design*, 89(9), 1758-1762.

ZHOU, X., JIN, W., TU, R., GUO, Q., HAN, S. F., CHEN, C., WANG, Q., LIU, W. & WANG, Q. (2019). Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 221, 502-508.

ZORN, S. M. F. E., PEDRO, G. A., AMARAL, M. S., LOURES, C. C. A., & SILVA, M. B. (2017). Avaliação Dos Fatores Envolvidos Na Extração De Lipídios Da Biomassa Da Microalga *Chlorella minutissima* Via Solventes. *HOLOS*, 2, 66-78.

ANEXO A

Dados diário do cultivo da microalga *P. Malhamensis* com suplementação de micronutrientes.

Tempo do cultivo (dias)	Intensidade luminosa	Intensidade luminosa		Temperatura (°C)
	Refletor LED ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Lâmpadas fluorescentes ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	pH	
1	412,75±96,27	94,99±0,76	7,23±0,17	28,65±3,04
2	460,14±163,29	108,21±29,00	7,22±0,17	29,40±1,27
3	431,71±1,22	110,51±32,25	7,25±0,14	28,55±1,34
4	382,59±0,00	107,27±42,93	7,27±0,11	29,80±1,84
5	336,92±84,08	103,22±42,93	7,26±0,13	31,90±4,81
6	323,13±103,58	102,68±42,17	7,16±0,06	30,55±1,48
7	323,13±103,58	103,76±43,70	7,31±0,06	30,45±2,76
8	573,89±158,42	108,42±42,27	7,26±0,17	28,65±1,20
9	564,41±145,02	125,75±9,92	7,27±0,28	29,80±1,84
10	583,36±171,82	123,80±7,16	7,25±0,30	29,15±0,49
11	510,12±68,24	123,12±6,20	7,48±0,11	28,95±2,05
12	554,07±130,39	125,28±9,25	7,38±0,28	29,00±0,71
13	475,65±19,50	127,85±12,88	7,47±0,06	30,15±2,33
14	524,77±88,96	122,72±5,63	7,35±0,05	28,90±1,98
15	518,74±80,43	129,87±15,74	7,32±0,01	27,15±0,49
16	418,78±60,93	127,51±12,40	7,32±0,01	29,25±2,47
17	431,71±42,65	121,84±4,39	7,33±0,03	28,15±0,49
18	512,71±71,90	123,33±6,49	7,35±0,06	29,80±5,23
19	466,17±6,09	126,70±11,26	7,35±0,01	30,60±0,14
20	509,26±67,02	125,69±9,83	7,34±0,09	29,50±2,83
21	509,26±67,02	125,69±9,83	7,31±0,02	30,05±0,78

ANEXO B

Dados diário do cultivo da microalga *P. Malhamensis* sem suplementação de micro e macronutrientes.

Tempo do cultivo (dias)	Intensidade luminosa	Intensidade luminosa	pH	Temperatura (°C)
	Refletor LED ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Lâmpadas fluorescentes ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		
1	208,53±51,18	85,68±6,68	7,66±0,18	27,75±1,06
2	224,04±12,19	79,27±6,20	7,62±0,06	27,25±1,06
3	241,27±12,19	86,35±1,91	7,58±0,06	28,50±1,41
4	215,42±24,37	81,63±0,95	7,70±0,06	27,75±0,35
5	225,76±14,62	83,15±2,62	7,70±0,11	28,25±1,06
6	287,81±68,24	83,99±5,25	7,74±0,12	27,25±0,35
7	261,09±32,90	79,41±0,29	7,70±0,04	27,75±0,35
8	269,71±8,53	84,33±4,77	7,63±0,00	28,75±0,35
9	279,19±4,87	84,33±4,77	7,73±0,01	28,75±0,35
10	278,33±28,03	85,68±2,86	7,72±0,00	28,75±0,35
11	274,88±13,40	89,05±1,91	7,72±0,08	28,75±0,35
12	269,71±32,90	89,73±2,86	7,70±0,14	28,75±0,35
13	251,61±34,12	90,40±3,82	7,70±0,14	28,75±0,35
14	235,67±60,32	84,33±0,95	7,79±0,13	28,75±0,35
15	256,78±34,12	84,33±0,95	7,81±0,16	27,75±1,77
16	282,64±2,44	83,32±1,43	7,83±0,17	29,25±0,35
17	286,94±8,53	85,01±1,91	8,02±0,04	29,25±0,35
18	267,13±26,71	85,01±8,50	7,92±0,79	28,00±2,80
19	275,74±27,57	84,33±8,43	8,05±0,81	28,50±2,85
20	284,36±28,43	81,63±8,16	8,17±0,82	29,00±2,90
21	284,36±28,43	91,75±9,18	8,33±0,83	29,00±2,90

ANEXO C

Dados diário de clorofila *a* da microalga *P. Malhamensis* em mg g⁻¹.

Tempo do cultivo (dias)	Sem micronutrientes extras	Com micronutrientes extra
1	6,47±0,32	1,98±0,08
2	11,49±0,69	6,66±0,55
3	6,86±0,57	9,50±0,67
4	6,38±0,24	6,68±1,70
5	6,85±0,27	5,70±0,2
6	8,70±0,71	6,89±0,71
7	7,56±0,18	6,06±0,39
8	7,73±0,56	7,38±0,32
9	8,51±1,03	7,76±1,02
10	7,18±0,50	9,52±0,65
11	7,01±0,25	14,82±0,52
12	8,06±0,40	14,05±0,92
13	9,50±0,34	17,55±2,47
14	10,79±0,78	15,56±2,75
15	13,85±0,67	15,52±2,37
16	16,81±1,22	16,84±0,49
17	19,26±1,47	14,70±1,97
18	20,33±1,25	12,41±1,68
19	20,73±0,86	10,18±2,08
20	17,07±0,31	8,77±1,44
21	16,46±0,44	9,45±1,01

ANEXO D

Dados diário de clorofila *b* da microalga *P. Malhamensis* em mg g⁻¹.

Tempo do cultivo (dias)	Sem micronutrientes extras	Com micronutrientes extra
1	6,69±0,35	1,87±0,15
2	12,18±0,70	3,04±0,30
3	10,95±0,77	7,96±1,79
4	10,40±0,47	7,57±4,55
5	9,08±0,22	7,78±0,39
6	9,99±0,79	8,93±0,82
7	8,23±0,32	6,25±0,23
8	10,09±0,84	6,25±0,33
9	14,31±1,93	5,47±0,66
10	13,15±1,05	5,91±0,40
11	13,62±0,51	8,69±0,54
12	14,58±0,64	8,21±0,51
13	17,16±0,75	9,47±1,22
14	17,70±1,27	8,97±1,58
15	12,90±0,38	14,40±2,00
16	14,22±1,40	14,34±0,47
17	16,14±1,76	12,29±1,76
18	11,59±1,34	13,20±1,66
19	12,73±4,58	13,47±2,51
20	9,27±0,45	12,10±1,59
21	8,58±0,24	14,47±0,83

ANEXO E

Dados diário de carotenoides da microalga *P. Malhamensis* em mg g⁻¹.

Tempo do cultivo (dias)	Sem micronutrientes extras	Com micronutrientes extra
1	0,25±0,02	0,07±0,08
2	0,00±0,00	2,37±0,31
3	0,00±0,00	0,42±0,73
4	0,00±0,00	0,06±0,11
5	0,00±0,00	0,00±0,00
6	0,00±0,00	0,00±0,00
7	0,00±0,00	0,01±0,02
8	0,00±0,00	0,46±0,26
9	0,00±0,00	0,71±0,28
10	0,00±0,00	1,00±0,28
11	0,00±0,00	2,59±0,29
12	0,00±0,00	2,47±0,30
13	0,00±0,00	3,46±0,55
14	0,00±0,00	2,06±0,46
15	1,79±0,20	0,62±0,33
16	2,49±0,32	1,07±0,36
17	2,57±0,06	1,04±0,25
18	1,13±0,76	0,17±0,18
19	0,33±0,29	0,00±0,00
20	0,00±0,00	0,00±0,00
21	0,00±0,00	0,00±0,00