



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

IGOR FERNANDO DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICROALGAS PARA EXTRAÇÃO E  
ANÁLISE DO ÓLEO**

MATÃO  
2020

IGOR FERNANDO DE OLIVEIRA

## **Isolamento e cultivo de microalgas para extração e análise do óleo**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Tecnologia em Biocombustíveis do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Câmpus Matão como pré-requisito para obtenção do grau de tecnólogo, sob orientação da Profa. Dra. Jane Karla de F. B. Machado.

MATÃO

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do IFSP – Campus Matão

O48i Oliveira, Igor Fernando de  
Isolamento e cultivo de microalgas para extração e análise do óleo.  
/ Igor Fernando de Oliveira.  
55 f.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Karla de Faria Borges Machado

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) - Instituto Federal de São Paulo. Campus Matão, Matão, 2020.

1. Energias renováveis. 2. *Scenedesmus Acuminatus*. 3. *Chlorella vulgaris*. 4. Biocombustível de 3º geração. I. Título. II. Instituto Federal de São Paulo - Campus Matão.

CDD 662

8/8063

IGOR FERNANDO DE OLIVEIRA

**Isolamento e cultivo de microalgas para extração e análise do óleo**

Banca Examinadora:



---

Profa. Dra. Jane Karla de Faria Borges Machado - Presidente  
Instituto Federal de São Paulo – Matão/SP



---

Profa. Dra. Caroline Peters Pigatto De Nardi.  
Instituto Federal de São Paulo – Matão/SP



---

Prof. Dr. Mauro Prato  
Instituto Federal de São Paulo – Matão/SP

Data do exame: 21/12 /2020

Avaliação: Aprovado

MATÃO  
2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e sabedoria para continuar e chegar até aqui. A toda minha família, principalmente a minha mãe Rosana de França de Oliveira que me deu o maior suporte. Aos meus amigos, Caio, Matheus Murilo, Nadine e aos demais que compartilharam a experiência em sala de aula e laboratório comigo.

Aos professores que passaram todos os conhecimentos necessários para minha formação, principalmente à professora e orientadora que teve a sabedoria de proporcionar conhecimentos, que me permitiram chegar ao final.

A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, enquanto a imaginação abraça o mundo inteiro, estimulando o progresso, dando à luz à evolução. Ela é, rigorosamente falando, um fator real na pesquisa científica.

Albert Einstein

## RESUMO

Os biocombustíveis são uma opção viável quando o assunto é a preservação ambiental e a busca por sustentabilidade. O Brasil é um dos pioneiros na utilização de energias renováveis e pesquisas que buscam alternativas ao uso de terras agricultáveis. A obtenção de biocombustível obtido por meio de fontes lipídicas de microrganismos é uma alternativa interessante e as microalgas são um dos principais representantes para a produção de biocombustível de 3<sup>o</sup> geração (3G). Este trabalho objetivou cultivar, isolar e identificar microalgas, bem como extrair e determinar o perfil lipídico do óleo obtido. Amostras de água de lago foram colhidas, sendo observada presença de microalgas. O cultivo foi realizado em meio BOLD em pH 7 e 8. Para melhorar o rendimento e o isolamento da biomassa de microalgas foi adicionado fósforo ao cultivo e agente floculante para a separação. Assim foi possível isolar e identificar as espécies: *Scenedesmus acuminatus* e *Chlorella vulgaris*. Na sequência foi realizada a secagem da biomassa em dessecador com sílica com identificador de umidade, em seguida foi realizado o pré-tratamento da biomassa utilizando a técnica de Bead Mill e a extração dos lipídeos por soxhlet. As amostras foram caracterizadas por cromatografia gasosa e o perfil composicional foi traçado utilizando o método EN 14103:20 com aplicação de um padrão de éster metílico de soja, confirmando a presença de ácidos graxos lipídicos (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C>20:0), semelhantes ao perfil cromatográfico encontrado no biodiesel de oleaginosa de soja. Portanto, o óleo obtido a partir das microalgas pode ser utilizado para a produção de biocombustível, tanto a *Chlorella vulgaris* quanto *Scenedesmus acuminatus*, apresentaram propriedades importantes para a obtenção de biodiesel, a *Chlorella vulgaris* apresentou em seu perfil cromatográfico maior percentual de ácidos graxos saturados que fornecem melhores estabilidade oxidativa, já o *Scenedesmus acuminatus* apresentou maior porcentual de ácidos graxos insaturados que contribuem para maior tolerância a baixas temperaturas.

**Palavras-chave:** Energias renováveis, *Scenedesmus acuminatus*, *Chlorella vulgaris*, Biocombustível de 3<sup>o</sup> geração.

## ABSTRACT

Biofuels are a viable option when it comes to environmental preservation and the search for sustainability. Brazil is one of the pioneers in the use of renewable energy and research that seeks alternatives to the use of agricultural land. Obtaining biofuel obtained from lipid sources of microorganisms is an interesting alternative and microalgae are one of the main representatives for the production of 3<sup>rd</sup> generation (3G) biofuel. This work aimed to cultivate, isolate and identify microalgae, as well as extract and determine the lipid profile of the oil obtained. Samples of lake water were collected, with the presence of microalgae being observed. Cultivation was carried out in B medium BOLD at pH 7 and 8. To improve yield and isolation of microalgae biomass, phosphorus was added to the culture and flocculating agent for separation. Thus it was possible to isolate and identify the species: *Scenedesmus acuminatus* and *Chlorella vulgaris*. Afterwards, the biomass was dried in a desiccator with silica with moisture identifier, followed by the pre-treatment of the biomass using the Bead Mill technique and the extraction of the lipids by soxhlet. The samples were characterized by gas chromatography and the compositional profile was traced using the EN 14103:20 method with the application of a methyl soy ester standard, confirming the presence of lipid fatty acids (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 and C>20:0), similar to the chromatographic profile found in soybean oil biodiesel. Therefore, the oil obtained from microalgae can be used for the production of biofuel, both *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acuminatus*, presented important properties for obtaining biodiesel, *Chlorella vulgaris* presented in its chromatographic profile a higher percentage of saturated fatty acids that provide better oxidative stability, whereas *Scenedesmus acuminatus* showed a higher percentage of unsaturated fatty acids that contribute to greater tolerance to low temperatures.

**Keywords:** Renewable energy, *Scenedesmus acuminatus*, *Chlorella vulgaris*, 3<sup>rd</sup> generation Biofuel.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microalgas filamentosas e não filamentosas cultivadas em Fotobiorreator.....	20
Figura 2: Tanque de sistema aberto, com condições naturais de iluminação e temperatura solar.....	21
Figura 3: Fotobiorreator em placa. ....	22
Figura 4: Extrator Soxhlet Convencional .....	25
Figura 5: Banho de Ultrassom.....	27
Figura 6. Sistema de coleta da amostra no lago. (a) Frasco de 300 mL utilizado na coleta, (b) sistema de coleta montado com o cabo de vassoura.....	29
Figura 7: Microscopia com aumento de 40 x. (a) Cultura de Microalgas de espécies variadas em pH 7. (b) Presença dos gêneros <i>Scenedesmus</i> (seta azul) e <i>Chlorella</i> (seta preta). (c) Cultura de Microalgas de espécies variadas em pH 8. (d) Presença de <i>Asterocapsa submersa</i> .....	35
Figura 8. Isolamento de microalgas utilizando a técnica de esgotamento ágar BOLD de pH 7 e 8, para isolamento de espécies.....	36
Figura 9. Cultivo de microalgas em meio BOLD com 7 dias de incubação. (a) Microalgas em pH 7. (b) Microalgas em pH 8.....	37
Figura 10 Microscopia com ampliação de 10 e 40x. (a) predominância de <i>Chlorella vulgaris</i> isolada no quarto repique, (b) predominância <i>Scenedesmus acuminatus</i> .....	37
Figura 11. Microscopia das espécies de microalgas. (a) Colônia de Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . (b) Colônia da microalga <i>Scenedesmus acuminatus</i> .....	38
Figura 12: Eficiência do solvente na extração de lipídeo da microalga de <i>Scenedesmus acuminatus</i> .....	39
Figura 13. Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus acuminatus</i> em pH 7 e 8 respectivamente da esquerda para direita, capacidade de cultivo de 5 L .....	40
Figura 14: Processo de decantação com agente flocculante. (a) Período de 4 h sobre ação do agente flocculante. (b) Decantação da biomassa após 48 h de repouso .....	41
Figura 15. Filtração simples da biomassa - lado esquerdo pH 7, lado direito pH 8.....	41
Figura 16. Biomassa seca após o cultivo com fósforo. (a) Biomassa seca de <i>Scenedesmus acuminatus</i> em pH 7 sem o fósforo e com fósforo a direita com maior massa. (b) Biomassa seca de <i>Chlorella vulgaris</i> em pH8 com fósforo a esquerda com maior massa e sem fosfato	42
Figura 17. Gráfico do Perfil cromatográfico de ácidos graxos das microalgas.....	45

Figura 18. Cromatogramas dos ésteres de ácidos graxos de microalgas *Chlorella vulgaris* ..46

Figura 19. Cromatogramas dos ésteres de ácidos graxos de microalgas *Scenedesmus ac* .....46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes formas do metabolismo das microalgas.....	23
Tabela 2. Preparação do meio de cultura BOLD.....	29
Tabela 3. Proporção de biomassa de microalga seca.....	42
Tabela 4. Teor lipídico da extração de microalgas com e sem Bead Mill.....	43
Tabela 5. Tempo de retenção de ésteres de ácidos graxos de Biodiesel de soja (Padrão).....	44

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

CNPE: Conselho Nacional de Política Energética

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

BM: Bead Mill

3G: Biocombustível de 3º geração

T<sub>R</sub>: Tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 MICROALGAS.....	18
3.2 CULTIVO DE MICROALGAS .....	20
3.3 ISOLAMENTO DE MICROALGAS .....	23
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS.....	24
3.5 BIOCOMBUSTÍVEIS .....	27
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
4.1 COLETA DA AMOSTRA E PREPARO DO MEIO DE CULTURA BOLD.....	28
4.2 ISOLAMENTO DAS MICROALGAS UTILIZANDO SEMEADURA POR ESGOTAMENTO .....	31
4.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS SOLVENTES.....	32
4.4 ADIÇÃO DE NUTRIENTES PARA MELHORAR O RENDIMENTO.....	32
4.5 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA-POR BEAD MILL .....	33
4.6 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS DAS MICROALGAS POR SOXHLET .....	33
4.7 COMPOSIÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
5.1 – CULTIVO DE MICROALGAS NO MEIO DE CULTURA BOLD.....	34
5.2- ISOLAMENTO DAS MICROALGAS UTILIZANDO SEMEADURA POR ESGOTAMENTO.....	35
5.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS SOLVENTES.....	38
5.4 ADIÇÃO DE NUTRIENTES PARA MELHORAR O RENDIMENTO.....	39
5.5 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA-POR BEAD MILL E EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS POR SHOXLET.....	43
5.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	44
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente pela ampla participação de fontes renováveis em sua matriz energética, pelas condições climáticas favoráveis, extensa disponibilidade de terra, e estímulos governamentais (EPE, 2016 b).

Especificamente para os biocombustíveis, ao longo dos anos, diversas políticas públicas foram implementadas, como o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), na década de 1970, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em 2005 e mais recentemente a Política Nacional dos Biocombustíveis (Renovabio) estabelecida pela Lei 13576/17 (EPE, 2018 a).

Dentre os países em desenvolvimento que mais consomem energia renovável no mundo, o Brasil é uma liderança com mais de 80% de toda a sua capacidade proveniente de fontes renováveis, principalmente, hidrelétricas. Dessa forma, o Brasil apresenta um histórico bem-sucedido no que se refere à produção e uso de biocombustíveis no setor de transportes, cuja participação alcançou 26,9 % em 2019, quando também foi registrado recorde na produção de etanol anidro e hidratado com 35.306.997 m<sup>3</sup>, e aumento do teor de biodiesel ao diesel para 12% em março de 2020 segundo a CNPE. Os dados estatísticos da ANP registraram ainda um aumento de 11,3 % de 2019 em relação a 2018 na produção de B (100), um equivalente de 5.901.104 m<sup>3</sup> em volume, segundo os dados estatísticos da ANP (ANP 2020).

Estes dados estão ligados ao segmento agropecuário, cuja diversidade de culturas disponibiliza uma variedade de coprodutos que podem ser direcionados para a produção de biocombustíveis e alimentos. Essa interface é benéfica, pois favorece a produção de biocombustíveis, promovendo a ampliação da matriz energética; contribui para a segurança alimentar ao desenvolver a agricultura e gerar renda de modo sustentável no campo; fomenta o desenvolvimento econômico regional e nacional; alivia os efeitos das mudanças climáticas globais, bem como reduz a emissão de poluentes locais, e ainda estabelece novas metas individuais compulsórias de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa para os distribuidores de combustíveis no âmbito da política nacional de biocombustíveis, de acordo com o programa RenovaBio (ANP, Resolução nº 791/2019).

Em vista destes desafios, diversos estudos e pesquisas vêm sendo realizados com o intuito de aumentar a produtividade através de modificação genética das culturas existentes, ou

encontrar alternativas viáveis para suprir a demanda sem causar maiores impactos sobre o meio ambiente e o abastecimento de alimentos. Com o forte apelo na diversificação das matérias-primas utilizadas na produção de biocombustíveis e, atualmente, também para bioprodutos e químicos renováveis, as microalgas entram no rol da aposta do Governo Federal (Embrapa. Agroenergia, 2016).

As microalgas são organismos unicelulares fotoautotróficos que habitam em sua maioria, ambientes aquáticos/úmidos, incluindo rios, lagos, oceanos e solos, se destacam por possuir vantagens consideráveis sobre matérias-primas tradicionais (oleaginosas) como: alta produtividade - geralmente de 10 a 100 vezes maior do que as culturas agrícolas tradicionais; captura de carbono altamente eficiente; elevado teor de lipídeos ou amido que podem ser utilizados para produção de biodiesel ou etanol, respectivamente; cultivo em água do mar, água salobra ou mesmo em águas residuais e produção sobre terras não agricultáveis (AZEREDO, 2012).

As microalgas também podem ser colhidas continuamente ao longo do ano todo em regiões tropicais, sem período de entressafra. Além disso, o cultivo e o processamento de microalgas podem ser realizados em um mesmo local, uma característica que favorece a produção integrada e sequencial de vários produtos e reduz os custos de logística nas instalações de biorrefinaria (Embrapa. Agroenergia, 2016).

Dentre os diversos biocompostos utilizados para a produção de biocombustíveis, o óleo de microalga possui um grande potencial energético (BASOVA, 2005). Trata-se de um lipídio extraído das células das microalgas e pode atingir até 27 % do peso seco da célula, percentual que pode duplicar ou triplicar quando são cultivadas sob condições de estresse (COBELAS, 1989). A presença dos ácidos graxos C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:0 foram confirmadas pelas análises de cromatografia gasosa nos extratos a partir da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, com variação de 19,27% a 49,02% nas conversões totais em ésteres das massas esterificadas (SILVA, 2013).

Atualmente, grande atenção está sendo dada a esse grupo de microrganismos frente à aplicação dos mesmos na obtenção de biocombustíveis, principalmente biodiesel, uma vez que, dependendo da espécie, é possível obter até 100 mil Kg de óleo por hectare/ano, um valor expressivo quando comparado ao óleo de dendê, caracterizada como uma das plantas com maior produção de óleo, cuja média de produção é de 4-6 t/ha/ano (DIAS *et al.*, 2019). Para se

igualar ao volume de óleo obtido das microalgas, outras culturas teriam que utilizar muito mais terras cultiváveis como por exemplo, 35 ha de dendê ou 280 ha de soja (BiodieselBR, 2007). Dentro deste panorama, acredita-se que alguma variedade transgênica de microalgas possa produzir óleo suficiente para substituir os 40 milhões de toneladas de diesel, com a economia de 235.000 ha cultivados. Além do biodiesel, as algas também podem ser matéria-prima para o etanol, bioquerosene, bioplásticos, biohidrogênio, biogás (metano) e intermediários químicos para o setor petroquímico (SINGH; GU, 2010).

Espera-se que a consolidação e o crescimento da produção de microalgas abram caminho no futuro próximo para mercados maiores e de valor agregado. Embora o Brasil tenha se lançado na produção de biocombustíveis de 3ª geração com atraso se comparado a países como Estados Unidos, Japão, Chile e alguns europeus, o desenvolvimento de um sistema de produção de microalgas de baixo custo adaptado à realidade regional poderá garantir, ao País, papel de protagonismo no cenário mundial em médio prazo (Embrapa. Agroenergia, 2016).

A produção de biomassa a partir de microalgas consiste em diversas etapas. A primeira etapa é o cultivo realizado em sistema aberto ou fechado e tem, como principais insumos de produção, energia solar, água, CO<sub>2</sub> e outros nutrientes como nitrogênio e fósforo. Devido à rápida proliferação das microalgas, a "colheita" da biomassa pode ser feita quase que diariamente. Essa coleta ocorre em um sistema, que geralmente apresenta duas etapas, existindo diversas opções tecnológicas para cada uma delas. Após a coleta, a biomassa segue para um sistema de secagem onde ocorre redução da umidade do material tornando-o mais adequado para o processamento industrial, seja de produção de biocombustíveis ou outros produtos (AZEREDO, 2012).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Cultivar microalgas em meio BOLD, isolar as espécies cultivadas, extrair o óleo e determinar o perfil lipídico do óleo de microalgas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Cultivar e isolar microalgas coletadas no lago do Ginásio de Esportes Décimo Chiozzini no município de Matão, SP, empregando meio de cultura BOLD em diferentes pHs.
- Determinar a eficácia do pré-tratamento para os processos de extração.

- Estudar a eficiência dos solventes no processo de extração.
- Determinar o teor de lipídeos das espécies isoladas através da extração por Soxhlet
- Traçar o perfil cromatográfico dos ésteres de ácido graxos extraídos das microalgas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microalgas

As microalgas pertencem a um grupo heterogêneos de organismos, sendo predominantemente aquáticos e unicelulares, podendo formar colônias que apresentam pouca ou nenhuma diferenciação celular. Seu desenvolvimento ocorre em suspensão na água quando são fornecidos todos os nutrientes necessários e, numa velocidade maior, quando há o fornecimento adequado de CO<sub>2</sub>. Comparadas a outras espécies fotossintetizantes que realizam captura e a utilização do CO<sub>2</sub>, as culturas de microalgas têm como principais vantagens a: alta produtividade, capacidade de capturar nutrientes das águas residuárias, de água salgada, além de ter elevada eficiência no uso da água. As microalgas são uma alternativa às oleaginosas como soja e palmáceas, por causa da sua elevada densidade de lipídios, o que pode ser convertido em maior produtividade de óleo por hectare. As microalgas podem ser cultivadas em uma instalação industrial, requerendo área muito menor, não exigindo fertilização de solo (MARTINS *et al.*, 2012).

As microalgas são classificadas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As principais classes de microalgas em termos de abundância são descritas por RAVEN (2015):

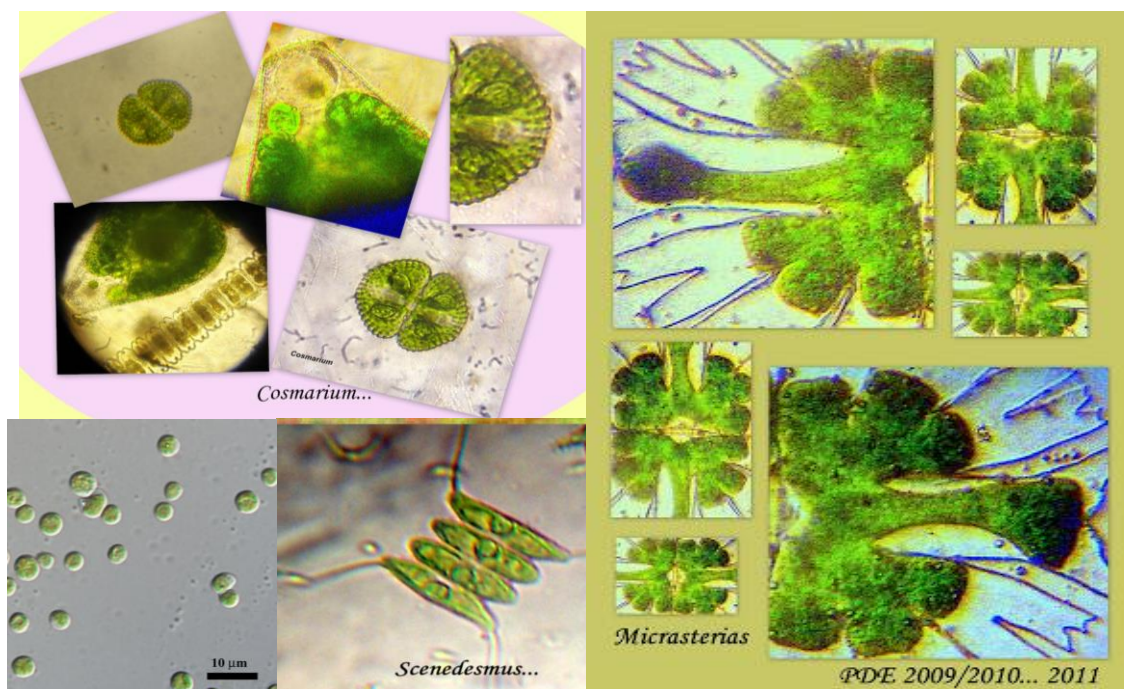
- a) Diatomáceas (Bacillariophyta): existem aproximadamente 100.000 espécies, sendo considerada a classe que domina o fitoplâncton dos oceanos, podendo ser encontradas também em ambientes de água doce. Apresentam sílica como constituinte da parede celular e a reserva de carboidratos se dá mediante óleo ou polímeros de carboidrato, conhecido como crisolaminarina.
- b) Algas Verdes (Chlorophyceae,): representadas por cerca de 17.000 espécies, são encontradas em sua grande maioria, em meio marinho ou em água doce.
- c) Cianobactérias (Cyanophyta): conhecidas por desempenharem papel importante na produção de oxigênio atmosférico, compreende cerca de 2.000 espécies, podendo ser encontrados em diversos ambientes.

d) Algas Douradas (Chrysophyceae), possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente de água doce, são semelhantes às diatomáceas.

Apesar de existirem diferenças estruturais e morfológicas que permitem classificar as microalgas em diferentes classes, estes organismos são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo às plantas (ABALDE *et al.*, 1995). São responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese (CHISTI, 2004).

Segundo Raven (2015), as microalgas que pertencem a divisão Chlorophyta, são encontradas em quase todos os ambientes aquáticos e úmidos. Elas possuem uma coloração verde por conta da presença dos plastídios ou também chamados plastos, que são organelas celulares também encontradas em células vegetais, contendo pigmentos fotossintetizantes como a clorofila a e clorofila b. A Figura 1, mostra uma montagem com variedade de espécies de microalgas que podem ser cultivadas em sistemas de biorreatores.

**Figura 1: Microalgas filamentosas e não filamentosas cultivadas em Fotobiorreator.**



Fonte: Montagem da Coletânea de micrografia de cultivo de microalgas (MARIANO, 2011).

Além da aplicação na produção dos biocombustíveis, as microalgas podem ser usadas para obtenção de biocompostos nutricionais e de saúde. Possuem aplicação também o tratamento de efluentes, pois degradam a matéria orgânica presentes durante o processo de bios-

sorção, que pode ser definida como a remoção de microrganismos, compostos e particulados metálicos de uma solução pela ação de organismos vivos (CALFA, 2007).

Os biocombustíveis obtidos a partir das microalgas são classificados em biocombustíveis de 3ª geração, pois são produzidos a partir da transesterificação dos lipídeos produzidos e acumulados nas células de microalgas. (MATA *et al.*, 2010; HADDAD e FAWAZ, 2013).

### **3.2 Cultivo de Microalgas**

O cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, o que possibilita grandes rendimentos anuais de biomassa. Além disso, o cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens como a simplicidade de nutrientes necessários, a multiplicação da biomassa em um curto período e a possibilidade de manutenção das suas condições, como temperatura, agitação e fotoperíodo para aumentar a produção de um metabólito específico (WOJCIECHOW *et al.*, 2013). O cultivo de microalgas em larga escala é usualmente feito em grandes tanques abertos com agitação promovida por pás rotativas ou em equipamentos fechados tecnicamente projetados, os chamados fotobiorreatores (MARTINS *et al.*, 2012).

Os tanques de sistemas aberto são mais simples, com condições naturais de iluminação e temperatura solar (SOUTO *et al.*, 2014). Os tanques tipo Raceway, consistem em lagoas de concreto com canais de recirculação em formato oval, com profundidade variando de 0,2 a 0,5 m e circulação feita através de aeradores, representado na Figura 2.

**Figura 2: Tanque de sistema aberto, com condições naturais de iluminação e temperatura solar.**



Fonte: Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), na UFSC. Foto: Roberto Derner.

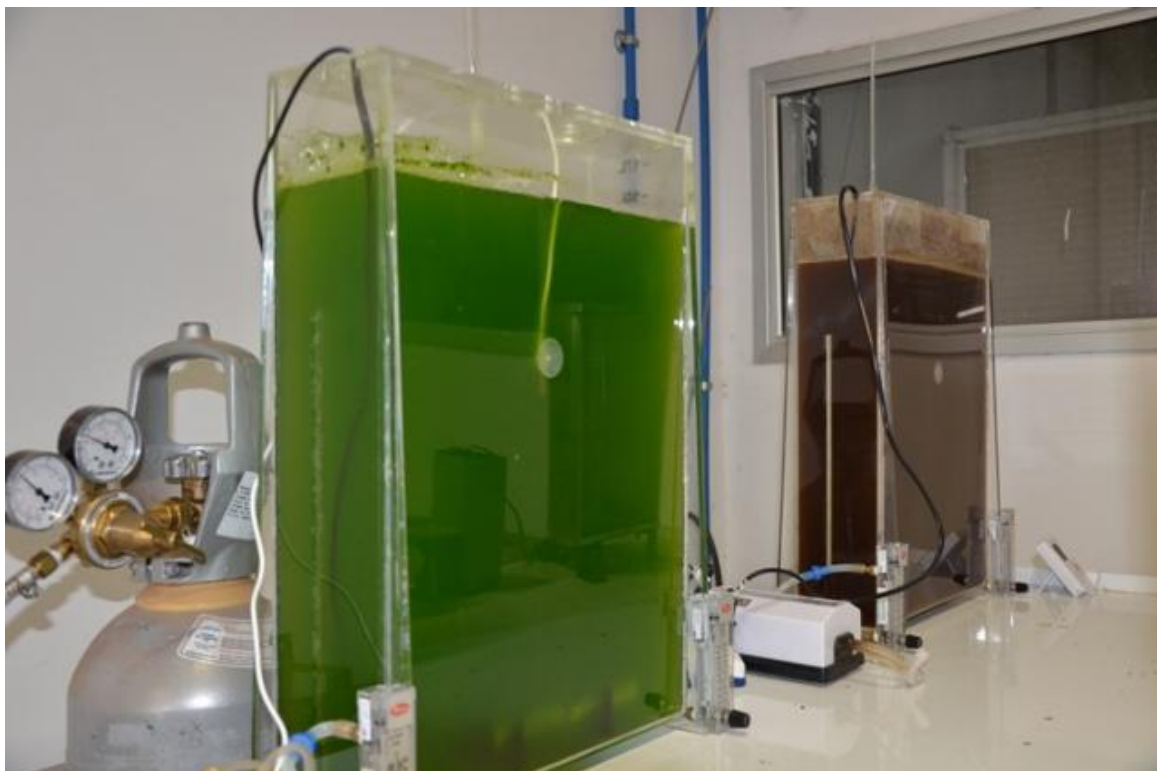
Apesar do baixo valor empregado na sua construção, a desvantagem de um sistema aberto que é a taxa de evaporação da água é alta, muito semelhante à das culturas terrestres, e o meio de cultivo fica mais suscetível à contaminação por espécies indesejáveis. O cultivo começa com as espécies inoculadas no tanque, mas com o tempo, inevitavelmente, espécies indesejáveis podem aparecer, atraídas por animais ou por outras condições do tempo, com isso o rendimento poderá ser severamente reduzido (FRANCO *et al.*, 2013).

Ainda segundo Franco (2013), pode-se conseguir o cultivo de uma única espécie por meio do isolamento de espécies extremófilas, que toleram condições extremas de temperatura, pH ou salinidade. Dois exemplos são as espécies *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima* que podem sobreviver a um pH alcalino variando de 9 a 11,5 e acabam se tornando as espécies dominantes nesses ambientes. Outro exemplo é a *Dunaliella salina* que se desenvolve bem em ambientes altamente salinos, isso se deve ao seu alto teor de glicerol intracelular, assegurando a sua proteção contra a pressão osmótica. Estas espécies extremófilas podem ser cultivadas em escala comercial utilizando sistemas abertos (FRANCO, 2013).

O cultivo em sistemas fechados usa os fotobiorreatores ou quimiostatos para a cultura contínua e não contínua das microalgas. As culturas contínuas são normalmente realizadas em biorreatores em circuito podendo ter formato tubular ou de placas, que promovem o crescimento das microalgas em um ambiente fechado com suprimento adequado de nutrientes,

temperatura e luz, representado na Figura 3. Os biorreatores e quimiostatos aumentam a produtividade e diminuem as chances de contaminação (WOJCIECHOW *et al.*, 2013).

**Figura 3: Fotobiorreator em placa**



Fonte: CHIES, 2015

Nas culturas não contínuas, a repicagem para um meio de cultivo estéril, com volume maior, permite que as condições como maior disponibilidade de nutrientes, luz etc., continuem favoráveis ao crescimento das microalgas. A repicagem deve ser feita durante a fase exponencial de crescimento da cultura. As curvas de crescimento e, conseqüentemente, o tempo até a fase de maior crescimento das microalgas depende da espécie e das condições de cultivo a que elas foram submetidas. Sendo assim, é imprescindível o conhecimento da curva de crescimento para cada espécie isolada. O tempo entre repicagens, em geral, fica em torno de 15 dias (WOJCIECHOW *et al.*, 2013).

A atividade metabólica das microalgas pode ser intensamente afetada pelas condições químicas e físicas do ambiente. Há vários fatores que podem tornar-se limitantes no desenvolvimento em laboratório, principalmente luz e temperatura (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). A luminosidade e a temperatura se relacionam diretamente com o crescimento das microalgas, pois a maioria das espécies são fotoautotróficas e retiram sua energia da luz solar,

convertendo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em biomassa através da fotossíntese. Na tabela 1, podem-se observar as principais formas de metabolismo das microalgas (SOUTO *et al.*, 2014).

**Tabela 1. Diferentes formas do metabolismo das microalgas**

<b>Metabolismo</b>	<b>Fonte de energia</b>	<b>Fonte de carbono</b>
<b>Fotoautotrófico</b>	Luz	Inorgânico
<b>Heterotrófico</b>	Composto orgânico	Orgânico
<b>Mixotrófico</b>	Luz ou composto orgânico	Inorgânico ou Orgânico
<b>Fotoheterotrófico</b>	Luz	Orgânico

Fonte: Adaptado de Chen *et al.*, 2011 apud SOUTO *et al.*, 2014

Como a luz tem grande importância para a maioria das microalgas, é necessário encontrar um ponto ótimo de intensidade luminosa, que proporcione a maior taxa de fotossíntese. Já a temperatura tem efeito nos processos enzimáticos, as microalgas podem sobreviver em uma ampla faixa térmica (SOUTO *et al.*, 2014). A aeração, o tamanho e a formato dos tanques também podem influenciar no desenvolvimento das microalgas (OSHE *et al.*, 2007 apud SOUTO *et al.*, 2014).

A disponibilidade de nutrientes, a salinidade e o pH interferem no crescimento das microalgas. Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O), hidrogênio (H) e fósforo (P), além de cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e potássio (K). Já com relação aos micronutrientes, geralmente requerem ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e cobalto (Co), enquanto algumas espécies também necessitam de baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (GUILLARD, 1975). O nitrogênio e o fósforo são nutrientes limitantes, mesmo que o carbono seja considerado o macronutriente mais importante (OSHE *et al.*, 2007 apud SOUTO *et al.*, 2014).

### **3.3 Isolamento de Microalgas**

Existem diversos métodos de isolamento de microalgas que devem ser escolhidos de acordo com o tipo de espécie que se quer isolar, e das condições da disponibilidade de amostra a ser utilizada. Se há pouco material, uma alternativa pode ser o enriquecimento da amostra com os nutrientes que melhor são absorvidos pelas algas, como por exemplo, o fósforo. A

amostra heterogênea de microalgas deve passar por um aumento populacional significativo, o que pode facilitar o isolamento da espécie de interesse. Essa técnica funciona muito bem para microalgas de crescimento rápido (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

O isolamento pode ser realizado por técnicas como:

**a) Isolamento por capilaridade:** Essa técnica consiste em pegar uma alíquota da amostra heterogênea contendo a microalga de interesse e colocá-la em uma primeira lâmina de microscopia. Em uma segunda lâmina, posicionada paralelamente à anterior, coloca-se pelo menos cinco gotas do meio de cultivo. As lâminas usadas no isolamento devem ser previamente armazenadas em um frasco fechado com etanol para esterilização. Com o auxílio do capilar, indivíduos da espécie de interesse são coletados da primeira lâmina e depositados na lâmina adjacente. Os microrganismos isolados na segunda lâmina podem ser transferidos e mantidos em tubo de ensaio ou em placas de cultura celular com meio de cultivo. Os recipientes contendo as células isoladas devem ser incubados em temperatura e intensidade luminosa para permitir o desenvolvimento das espécies previamente isoladas (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

**b) Por diluição seriada:** Esse procedimento é realizado pipetando 1,0 mL, a depender da magnitude da contaminação por outros microrganismos ou microalgas da amostra original em um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de meio de cultivo estéril. Dessa primeira diluição, pipeta-se 1,0 mL em outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de meio de cultivo estéril e assim por diante. As amostras diluídas devem ser incubadas e monitoradas. Esse procedimento é recomendado para espécies filamentosas. Para espécies não filamentosas, recomenda-se que a diluição seja realizada da mesma maneira em placas de Petri contendo meio sólido (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

**c) Inoculação em placa de Petri:** Inocula-se amostra contendo a microalga de interesse nas placas de Petri com meio de cultivo Ágar-Ágar, próprio para o cultivo das microalgas. Assim, as placas devem ser incubadas e em alguns dias as colônias começam a se tornar visíveis, a partir daí podem ser facilmente coletadas e inoculadas em meio líquido estéril (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

### 3.4 Métodos de Extração de lipídios

A extração por solvente é um processo de transferência de componentes solúveis (óleo) de um material inerte (matriz lipídica) para um solvente. O processo que ocorre é puramente físico, pois o óleo transferido para o solvente pode ser recuperado sem qualquer reação química. A extração de lipídios é uma decisão importante para pesquisas bioquímicas, fisiológicas e nutricionais, por isso deve ser realizada com precisão. Algumas amostras requerem atenção especial para a obtenção da fração lipídica, pois fatores como co-extração de componentes não lipídicos e oxidação indesejável podem afetar a qualidade final da fração lipídica (BRUM *et al.*, 2009).

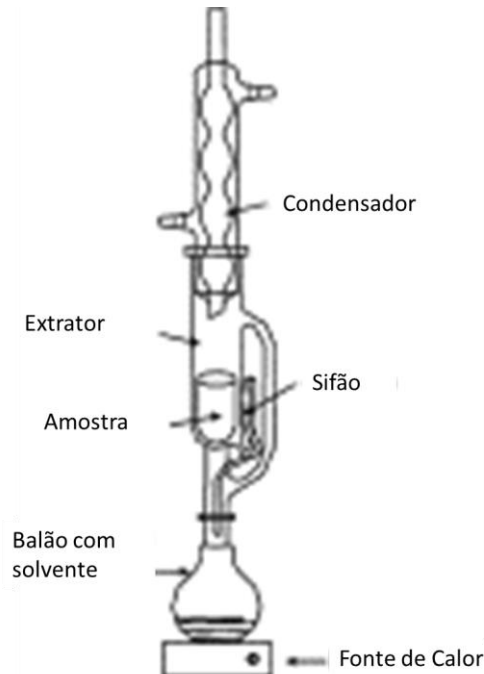
Segundo Andrade (referência?), os métodos mais tradicionais de extração de lipídios são os processos químicos, utilizando solventes orgânicos como benzeno, clorofórmio, éter e hexano. Os solventes orgânicos são muito utilizados na extração do óleo das microalgas, mas devido ao seu potencial antioxidante e a polaridade dos compostos, o rendimento da extração depende do tipo de solvente utilizado no processo (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997 apud CARDOSO *et al.*, 2014).

Há solventes que não conseguem romper totalmente a parede celular da microalga, e com isso obtêm-se um menor rendimento de óleo (CARDOSO *et al.*, 2014). Entre os métodos mais tradicionais que utiliza solventes orgânicos estão a extração por Ultrassom e a extração por Soxhlet.

A extração por Soxhlet consiste em um processo contínuo de extração de lipídios a partir de material biológico. Os óleos/gorduras são extraídos por repetidas lavagens com solvente orgânico de refluxo. Neste método, a amostra é seca, triturada em pequenas partículas e colocada em um cartucho poroso. Em seguida, a amostra dentro do cartucho é colocada na câmara de extração que está suspensa acima do balão que contém o solvente, e abaixo de um condensador (Figura 4). O balão é aquecido para promover a ebulição do solvente, então a fase gasosa se move em direção ao condensador que condensa o vapor em líquido, este líquido goteja sobre o cartucho que contém a amostra, assim o solvente entra em contato com amostra, arrastando os lipídeos por afinidade química. Em seguida o solvente volta para o balão por meio do sistema de sifão e inicia-se novamente o processo de refluxo que se repete por várias vezes. As amostras são lavadas pelo solvente por um período de 3 a 8 h, até que

toda a matéria lipídica da amostra seja removida para o solvente. Após a extração por Soxhlet o solvente é roto evaporado e a fração lipídica é concentrada (BRAZACA, 2016).

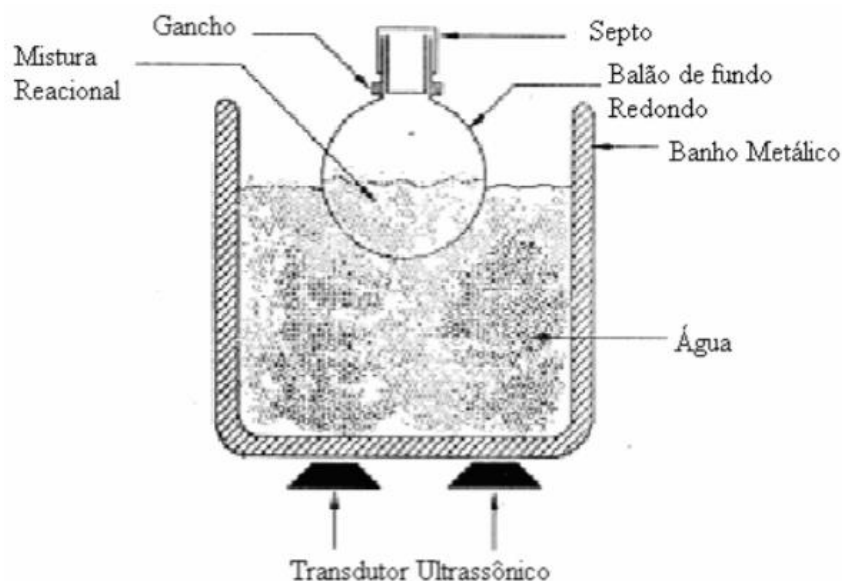
**Figura 4: Extrator Soxhlet Convencional**



Fonte: Adaptado De Castro & Priego-Capote.

Metodologias de pré-tratamento que empregam o ultrassom tem se demonstrado mais eficientes do que os pré-tratamentos convencionais utilizados para extração lipídica de microalgas, pois são capazes de romper a parede celular destes microrganismos facilitando o carregamento dos lipídeos por solventes orgânicos. O ultrassom promove cavitação em ciclos rápidos de compressões e descompressões, e altas temperaturas, a Figura 5 ilustra mostra o mecanismo de funcionamento do banho de ultrassom. (BRANDALIZE *et al.*, 2014).

**Figura 5: Banho de Ultrassom.**



Fonte: Adaptado de SCHNEIDER, 2005

A extração do óleo das microalgas por ultrassom é utilizada para extrair compostos com peso molecular baixo, aumentando assim o rendimento devido a sua eficiência e sua demanda energética menor, se comparado com outras técnicas de extração (MACÍAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2009). Outras vantagens da extração utilizando ultrassom são a redução do tempo e do volume de solvente necessários, diminuindo possíveis danos ambientais (MATA *et al.*, 2009).

Comparada com a extração por Soxhlet, a extração por ultrassom é realizada em um período de tempo mais curto (cerca de 15 minutos), e o solvente pode ser recuperado por de maneira mais simples. Para Otimizar os parâmetros de extração por ultrassom, obtendo maior eficiência e reprodutibilidade, devem ser utilizados solventes com diferentes polaridades, variação no tempo de extração, diferentes volumes de amostra e teores de água. (COTTA, 2009).

### 3.5 Biocombustíveis

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir parcial ou totalmente combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol, obtido a partir de cana-de-açúcar e, o biodiesel, produzido a partir de óleos vege-

tais ou de gorduras animais, e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis. O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), estabelecido por intermédio da Lei nº 11.097/2005 (BRASIL, 2005), inseriu esse biocombustível na matriz energética nacional. Desde que foi instituído o uso obrigatório do biodiesel na mistura com o diesel fóssil, observou-se uma rápida evolução para maiores teores de adição. O valor inicial foi fixado em 2% em volume, com elevação gradual dos percentuais mínimos obrigatórios no diesel B, chegando a 12% em março de 2020 (ANP, 2020).

A Resolução ANP nº 758/2018 busca aumentar a vida útil do óleo diesel B (diesel com mistura de biodiesel) em todas as suas etapas de comercialização, e com isso tornar mais segura a implantação das misturas subsequentes (ANP, 2018a). O aumento da concentração de biodiesel B15, previsto no PROCONVE P8, oitava fase do Programa de Controle da Poluição do Ar, que utilizará a nova tecnologia de redução de poluentes no escapamento que poderá ser utilizada no Brasil a partir de 2022/23, quando se prevê a entrada em vigor desta fase para veículos pesados (MME, 2019c).

Deste modo, os biocombustíveis surgem como uma opção que se ajusta a esse processo de desenvolvimento sustentável, uma vez que são produzidos a partir de fontes de energia renováveis, contribuindo para a diminuição dos impactos ao meio ambiente e proporcionando uma alternativa promissora para diversificar o setor energético (ARAÚJO *et al.*, 2012).

Entre as possibilidades para a produção de biocombustíveis, o uso das microalgas como fonte viável de biomassa tem causado grande expectativa no setor de bioenergia (FRANCO *et al.*, 2013, p. 437). Segundo Schmitz (2012), as microalgas podem ser utilizadas para a produção de biometano, bioetanol, biohidrogênio, bioquerosene e biodiesel, este último se deve a capacidade das microalgas acumularem lipídeos nas células, os quais, após extração, são transesterificados para a obtenção do biodiesel (MATA *et al.*, 2010; HADDAD e FAWAZ, 2013).

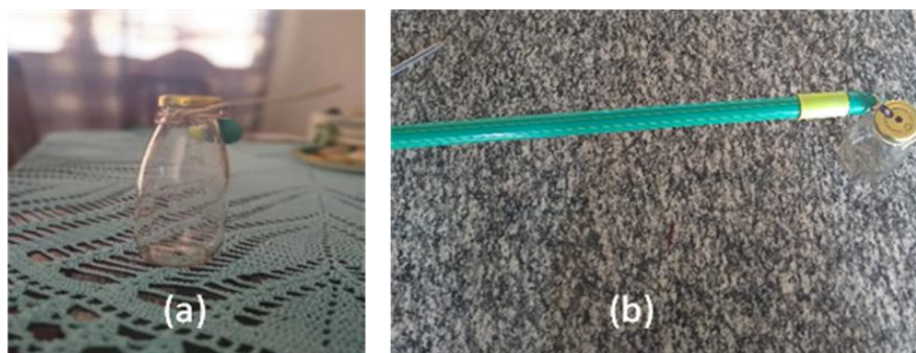
## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta da Amostra e preparo do meio de cultura BOLD**

Inicialmente foram coletados 300 mL de água do lago do Ginásio de Esportes Décimo Chiozzini no município de Matão, SP, situado no Centro. A coleta de amostras foi realizada utilizando os seguintes materiais: cabo de vassoura, recipiente de vidro estéril de 300 mL e

um arame para prender o recipiente ao cabo de vassoura, a Figura 6 representa o sistema de coleta.

**Figura 6. Sistema de coleta da amostra no lago. (a) Frasco de 300 mL utilizado na coleta, (b) sistema de coleta montado com o cabo de vassoura.**



Fonte: Elaborado pelo autor

O frasco de coleta foi devidamente limpo e esterilizado em autoclave, sob uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,0 atm. durante 15 minutos. O frasco esterilizado foi preso em um cabo de vassoura para aumentar o alcance e distanciar a coleta da margem do lago, diminuindo o risco de contaminação. O frasco de coleta não deve ser totalmente preenchido com a amostra, para que assim permita as trocas gasosas dos organismos. A amostra foi transportada em recipiente fechado a temperatura ambiente até o laboratório, onde foi observada a presença de microalgas, utilizando microscópio óptico. Após a confirmação da presença de microalgas, a amostra bruta foi acondicionada em geladeira para que houvesse a preparação do meio BOLD, a uma temperatura de 7,1 °C onde pode permanecer por no máximo 4 dias (OLIVEIRA, 2018).

O meio de cultura BOLD foi preparado conforme especificado na Tabela 2, as soluções estoques do meio de cultura foram diluídas em água destilada e armazenada em frascos âmbar, em freezer a 8°C (OLIVEIRA, 2018).

Tabela 2. Preparação do meio de cultura BOLD.

Reagentes	Componente	Solução estoque (g/L H <sub>2</sub> O)	Quantidade utilizada (ml)
<b>Nitrato de Sódio</b>	NaNO <sub>3</sub>	6,50	10 ml
<b>Cloreto de cálcio</b>	CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,625	10 ml
<b>Cloreto de Magnésio Heptahidratado</b>	MgCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,875	10 ml
<b>Hidrogenofosfato de Potássio</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,875	10 ml
<b>Dihidrogenofosfato de Potássio</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,375	10 ml
<b>Cloreto de Sódio</b>	NaCl	0,625	10 ml
	Solução alcalina de EDTA		
<b>Etilenodiaminotetracético Anidro</b>	EDTA	1,25	10 ml
<b>Hidróxido de Potássio</b>	KOH	0,775	10 ml
	Solução acidificada de Ferro		
<b>Sulfato de Ferro</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,245	1 ml
<b>Ácido Sulfúrico</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	
	Solução de Boro		
<b>Ácido Bórico</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,855	1 ml
	Solução de Metais-traço		
<b>Sulfato de zinco heptahidratado</b>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,205	1 ml
<b>Sulfato de Manganês Tetrahidratado</b>	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44	1 ml
<b>Molibdato de Amônio</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,71	1 ml
<b>Sulfato de Cobre Pentahidratado</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57	1 ml
<b>Nitrato de Cobalto Hexahidratado</b>	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49	1 ml

Fonte: adaptado de BISCHOFF; BOLD, 1963

Após o preparo das soluções estoque, detalhadas na Tabela 2, preparou-se 250 ml de meio BOLD líquido e foram adicionados 100 µL da amostra de microalgas coletada no lago. As microalgas foram cultivadas nas condições de fotoperíodo 16/8, aeração por meio de motor de aquário, temperatura de 25 °C e pH 7 e 8. Esse sistema foi mantido por uma semana em meio de cultura BOLD (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Logo após o preparo do meio de cultura BOLD, foram definidas três faixas de pH, o pH 6 moderadamente ácido, o pH 7 neutro e pH 8 moderadamente alcalino. Segundo Wojciechowski (2103), as faixas de pH 7 e 8 são consideradas ótimas para o desenvolvimento das microalgas, pH pode interferir diretamente nos metabolismos das microalgas atuando na permeabilidade da membrana, no transporte iônico e na velocidade enzimáticas.

Para a aferição do pH do meio de cultura foi utilizado um potenciômetro, Policontrol pH-250, colocado dentro do fluxo laminar com a superfície devidamente limpa com álcool 70, duas lamparinas e 15 minutos com a luz UV ligada para garantir um ambiente estéril antes de iniciar a medição.

A correção de pH do meio de cultura foi realizada com as soluções de NaOH 1,0 M e HCl 1,0 M, conforme estabelecida por Oliveira (2018). É importante a correção do pH para 7, a esterilização do meio de cultura na autoclave abaixa o pH para 6, este pH ácido segundo Wojciechowski (2013), prejudica o desenvolvimento das microalgas.

#### **4.2 Isolamento das microalgas utilizando sementeira por esgotamento**

A técnica de sementeira por esgotamento foi utilizada para a realização do isolamento de microalgas, essa técnica consiste em inocular amostras contendo as microalgas de interesse em placas de Petri preparadas com meio de cultura BOLD e 2,5% ágar puro para a gelificação (OLIVEIRA, 2018).

As placas de Petri semeadas permaneceram incubadas em meio BOLD em condições específicas para o desenvolvimento das microalgas (fotoperíodo 16/8; temperatura de 25°C; pH 7 e 8), por um período de aproximadamente 7 dias até o aparecimento das colônias. Com auxílio de uma alça de platina devidamente esterilizada em chama, foi obtida uma pequena porção da colônia e repicada em outra placa de Petri com meio de cultura já preparado, as placas foram incubadas utilizando às condições anteriores (OLIVEIRA, 2018).

Este procedimento foi repetido por pelos menos quatro vezes, ou até a observação do isolamento da espécie predominante. Após os vários repiques, deve-se transferir as colônias das espécies isoladas para o meio de cultura BOLD líquido com o auxílio de uma alça de platina. Todos os procedimentos devem ser realizados dentro da capela com fluxo laminar e meio de cultura estéril, tomando todas as medidas para manter o ambiente livre de contaminação. As microalgas com as espécies isoladas devem ser cultivadas nas condições já estabelecidas, fotoperíodo 16/8; aeração por meio de motor de aquário; temperatura de 25 °C; pH 7 e 8 (OLIVEIRA, 2018).

### 4.3 Determinação da eficiência dos solventes

Com as espécies predominantes foi possível realizar a secagem da biomassa e o pré-tratamento por técnica Bead Mill, em seguida foi utilizado diferente solvente e misturas de solventes polares e apolares para determinar a eficiência no processo de extração dos óleos por Soxhlet. Segundo Ramluck (2014) a mistura de solventes com polaridades distintas melhora a eficiente da extração (RAMLUCK, 2014).

Foi utilizado 100 mL dos solventes (Acetato de Etila, Diclorometano/Metanol 9:1, Hexano e Clorofórmio) e aproximadamente 0,2 g de biomassa seca de microalgas, o sistema permaneceu em refluxo no aparelho soxhlet de 3 a 5 horas e após o tempo de extração o solvente foi recuperado por roto-evaporação. O teor de lipídeos presentes nas espécies isoladas em diferentes solventes foi determinado utilizando a Equação 1.

$$\boxed{T_L = \frac{X_1}{X_2} \times 100} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$T_L$  = Teor de lipídeo

$X_1$  = Massa do lipídeo extraída

$X_2$  = Biomassa seca

Com os resultados obtidos nas extrações, foi determinada a eficiência dos solventes para a extração lipídica de microalgas.

#### 4.4 Adição de nutrientes para melhorar o rendimento

As microalgas *Scenedesmus acuminatus* e *Chlorella vulgaris*, obtidas e isoladas no item 4.2 foram transferidas para Kitassato estéril de capacidade de 5 L. Para aumentar a produção do cultivo foi utilizado 50 mL de microalgas *Chlorella vulgaris* pH 7 e 50 mL de microalgas *Scenedesmus acuminatus* em pH 8, transferidas para Kitassatos estéreis. As condições do cultivo (fotoperíodo 16/8 e aeração) das microalgas foram mantidas. O período de incubação mínimo para promover o crescimento das microalgas foi de aproximadamente 20 dias.

Em seguida, para melhorar o rendimento de obtenção da biomassa de microalgas, foi adicionado fósforo ao meio de cultura, utilizando 5,0 g/L de fosfato de cálcio, adicionando – o ao meio Bold e autoclavando para que não ocorresse contaminação por outros microrganismos como, bactéria e fungos. Segundo Becker (2008), o fósforo é o nutriente necessário para o crescimento normal das algas, pois é essencial para quase todos os processos celulares, tais como a biossíntese de ácidos nucleicos e a transferência de energia. Para determinar a eficácia do fósforo no crescimento das microalgas foi realizado a comparação de massa percentual antes e depois da adição do Fósforo.

#### 4.5 Pré-tratamento da biomassa-por Bead Mill (BM)

Após o cultivo das microalgas com fósforo, foi adicionado 5 mg do agente flocculante para 5 L de amostra, metodologia descrita por Santos (2014). Os valores foram ajustados para a proporção do meio de cultivo das microalgas que foram filtradas e secas em dessecador em temperatura ambiente para obtenção da biomassa seca.

A técnica Bead Mill adaptada de Jarenkow (2014) foi usada no pré-tratamento para a ruptura da parede celular das microalgas visando facilitar a extração dos óleos das microalgas por meio choque mecânico entre a biomassa e as pérolas de ebulição. Em um tubo de ensaio, foi adicionado 4,0 g de amostra de biomassa de microalgas seca, algumas pérolas de ebulição e 3,0 mL de acetato de etila, o sistema foi submetido à agitação constante em Vórtex por 10 min. Após o pré-tratamento a biomassa das microalgas foram armazenadas em dessecador por 24 horas para a evaporação do solvente (JARENKOW, 2014).

O uso da técnica BM é de suma importância para que ocorra a ruptura da parede celular com o choque físico entre as pérolas e as células expondo o material lipídico, e facilitando

a extração por solventes. Segundo Jarenkow (2014), a vantagem de se usar a técnica Bead Mill é que pode ser operado em processos contínuos e em escalas de maiores volumes.

#### **4.6 Extração dos lipídeos das Microalgas por Soxhlet**

O processo de extração foi realizado com massas de 4,0 e 8,0 g de amostra em 100 ml de solvente orgânico (Acetato de Etila), enriquecido com a fase líquida do solvente utilizado no pré-tratamento BM. Os sistemas Soxhlet foram mantidos em refluxo de 3 horas no processo de menor massa e 8 horas para a amostra com oito gramas.

Após extração em Soxhlet, as amostras foram roto-evaporadas para recuperação dos solventes e purificação da fase lipídica de microalgas. Com término da roto-evaporação e com as amostras já secas foi realizado um comparativo de peso do lipídio extraído das microalgas com o pré-tratamento BM e sem o pré-tratamento.

A fase lipídica foi submetida à cromatografia gasosa para traçar o perfil da composição graxa e verificar a viabilidade para síntese de obtenção de biodiesel.

#### **4.7 Composição do perfil de ácidos graxos das microalgas por cromatografia gasoso.**

Após a extração dos lipídeos foi possível determinar o perfil de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa CG-FID, foi utilizado a Norma BS EN 14103:20 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contentes, em cromatografia gasosa – FID, equipamento da Thermo.

Os parâmetros utilizados seguiram a Norma BS EN 14103:20. Temperatura inicial 250°C, rampa de aquecimento: 120°C; 180°C – 10 min; 230°C – 5 min; 300°C – 20 min, temperatura final 300°C, coluna 5% difenildimetilpolissiloxano – 30 m, gás de arraste He, modo de injeção Split 100:1, velocidade linear do gás de arraste 45.0 cm/seg., fluxo de gás de arraste 3,0 mL/min., tempo total de análise 30 min. Para aplicação da metodologia adotada foi necessária a esterificação dos óleos de microalgas. Para reação de esterificação foi utilizado 10 mL de metanol, 0,2 g KOH (85 % pureza), 2,0 mL do lipídeo de microalga. As condições da análise foram de 1 µL de amostra esterificada e metanol como solvente para diluição na razão de 1:100.

Após as análises, as áreas dos picos do cromatograma foram integradas para definir porcentagem relativa em área de cada componente (análise semiquantitativa).

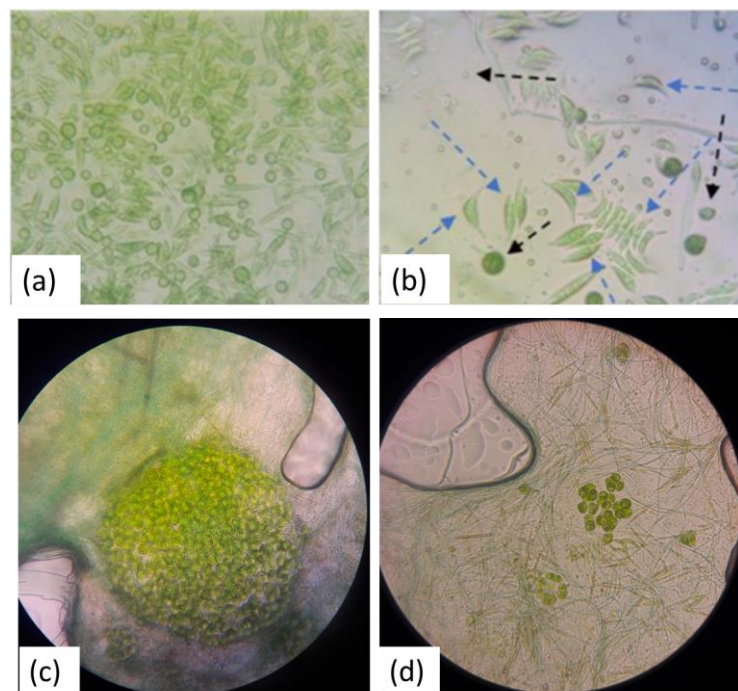
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – Cultivo de microalgas no meio de cultura BOLD

Com as condições ideais estabelecidas (fotoperíodo de 16/8, e aeração com compressor de ar para aquários a temperatura de 25°C e pH 7 e 8), as microalgas apresentaram desenvolvimentos satisfatório.

Os meios de cultura BOLD de pH 7 e 8, promoveram o crescimento favorável das microalgas, a Figura 7 mostra a microscopia das amostras em pH 7 e 8, as imagens obtidas no microscópio com ampliação de 40 x e 100 x, foram comparadas às imagens do atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras (AZEVEDO, 2012). No meio de cultura BOLD de pH 6 não foi observado o desenvolvimento de microalgas, pois o pH ácido prejudica o seu desenvolvimento.

**Figura 7: Microscopia com aumento de 40 x e 100 x. (a) Cultura de Microalgas de espécies variadas em pH 7. (b) Presença dos gêneros *Scenedesmus* (seta azul) e *Chlorella* (seta preta). (c) Cultura de Microalgas de espécies variadas em pH 8. (d) Presença de *Asterocapsa submersa*.**



Fonte: elaborado pelo autor

Segundo WOJCIECHOWSKI *et al* (2013), o ambiente aquático apresenta variações de pH de 6 a 9, favorecendo mudanças do estado químico de substâncias importantes para as microalgas como CO<sub>2</sub>, fosfato, amônia, ferro e metais-traço. A mudança de pH interfere diretamente no metabolismo das microalgas, interferindo na permeabilidade da membrana, no transporte iônico e na velocidade das reações enzimáticas.

## 5.2- Isolamento das microalgas utilizando Semeadura por esgotamento

Após o cultivo em pH 7 e 8, iniciou-se as tentativas de isolamento. Foram realizadas várias tentativas, entre elas o método de pesca com micropipeta sobre microscópio ou lupa, porém todas as tentativas foram sem sucesso.

Com a sementeira por esgotamento em profundidade do cultivo contendo meio BOLD e ágar nutriente, incubados em fotoperíodo de 16/8, temperatura de 25°C e pH 7 e 8 (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). A técnica utilizada para o isolamento das microalgas, sementeira por esgotamento, foi satisfatória e as placas de Petri com ágar BOLD incubadas por 7 dias a 25 °C, podem ser observadas na Figura 8.

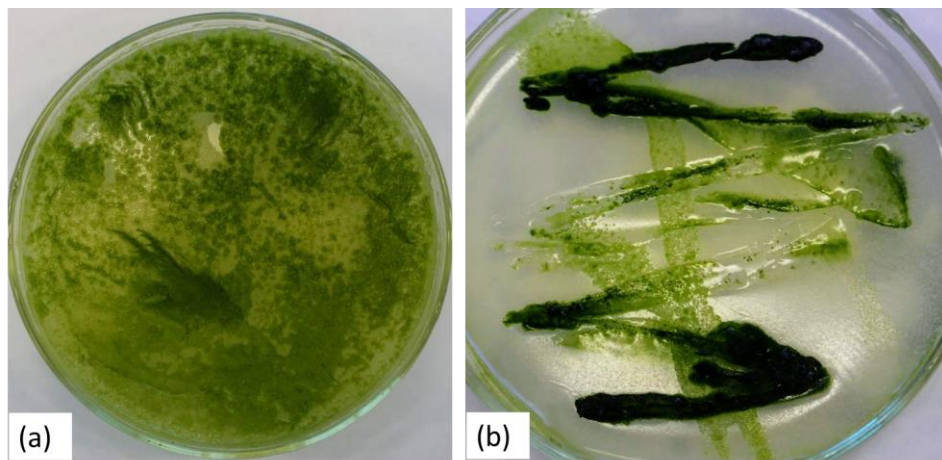
**Figura 8. Isolamento de microalgas utilizando a técnica de esgotamento ágar BOLD de pH 7 e 8, incubadas em B.O.D, para isolamento de espécies.**



Fonte: elaborado pelo autor

Após o período de sete dias foi possível observar o aparecimento das colônias de microalgas mostrado na Figura 9.

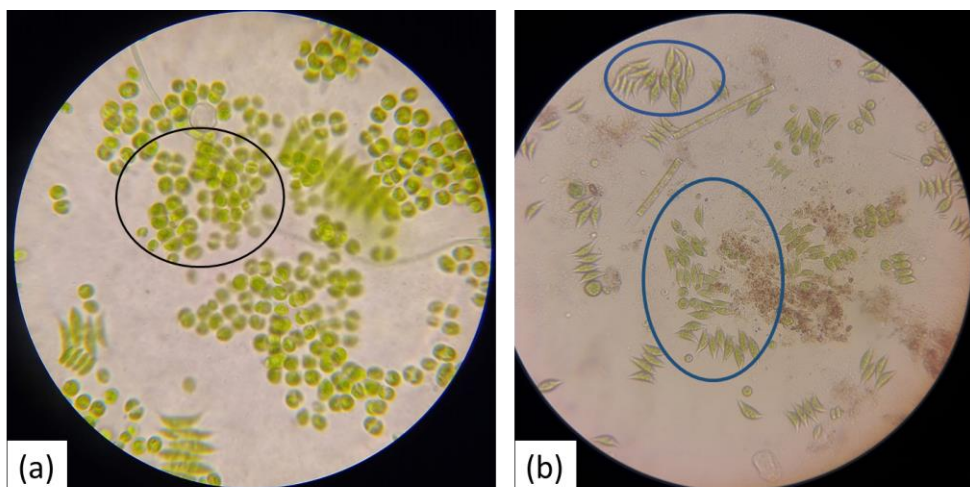
**Figura 9. Cultivo de microalgas em meio BOLD com 7 dias de incubação. (a) Microalgas em pH 7. (b) Microalgas em pH 8.**



Fonte: elaborado pelo autor

Após o isolamento de colônias no ágar BOLD, foi realizada a transferência das colônias para o meio BOLD líquido, promovendo o cultivo das microalgas em escala maior. O isolamento foi parcial, sendo necessária 4 repiques posteriores para conseguir isolar totalmente as espécies. Com isso, foi possível ter a predominância dos gêneros identificados como *Chlorella* e *Scenedesmus*, desenvolvidas em pH 7 e 8 respectivamente, observadas na Figura 10.

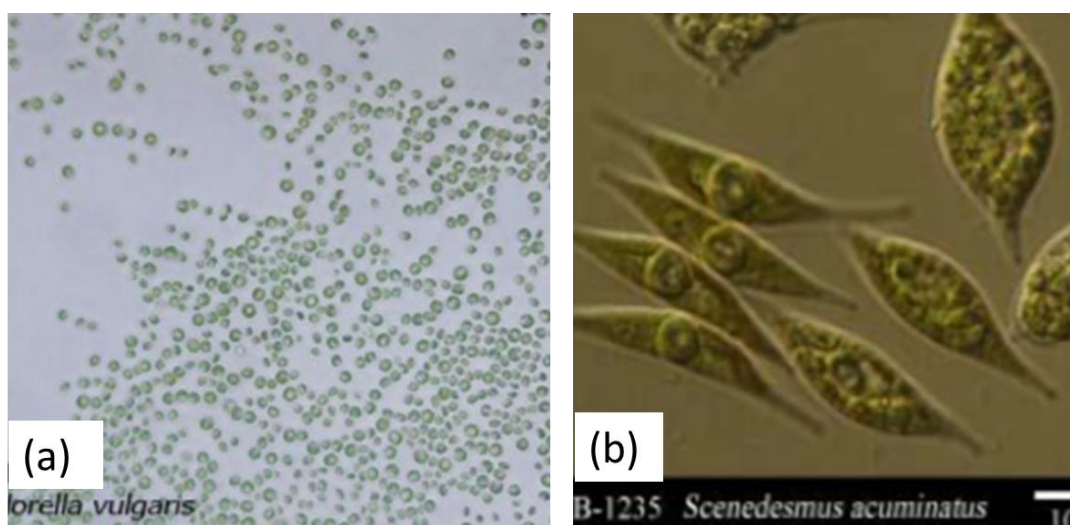
**Figura 10 Microscopia com ampliação de 10 e 40x. (a) predominância de *Chlorella vulgaris* isolada no quarto repique, (b) predominância *Scenedesmus acuminatus*.**



Fonte: elaborado pelo autor

As espécies foram identificadas pelo método comparativo com a literatura, foi utilizado o atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras (AZEVEDO *et al.*, 2012). As imagens utilizadas para comparação pertencem aos laboratórios Utex LB e Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, representadas na Figura 11.

**Figura 11. Microscopia das espécies de microalgas. (a) Colônia de Microalga *Chlorella vulgaris*. (b) Colônia da microalga *Scenedesmus acuminatus*.**

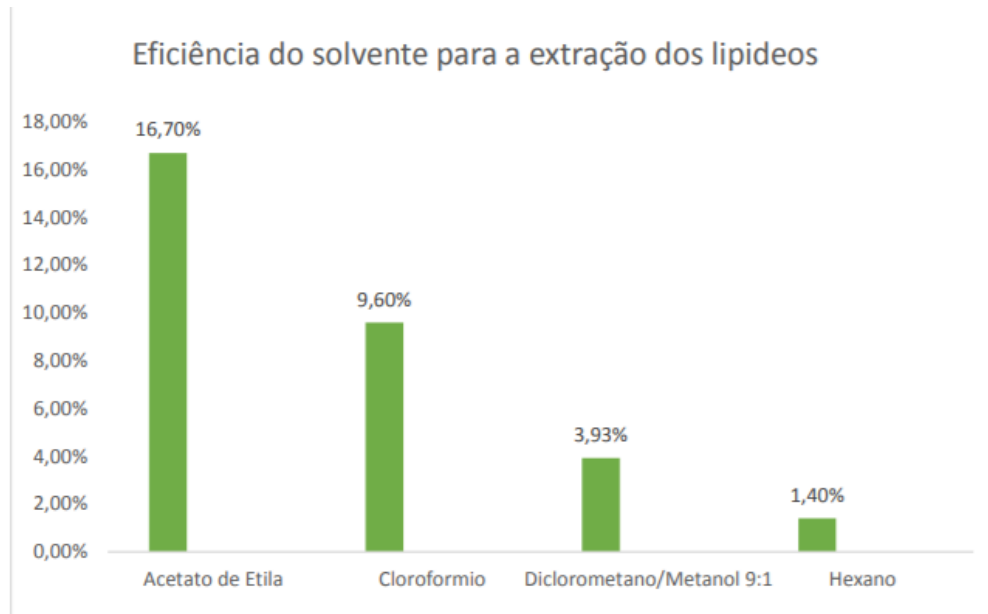


Fonte: Utex LB e Institute of Hydrobiology

### 5.3 Determinação da eficiência dos solventes

Os resultados obtidos com extração da fração lipídica de microalgas utilizando solventes com diferentes polaridades e misturas de solventes, estão apresentados na Figura 12 e demonstraram que, para as microalgas *Scenedesmus acuminatus*, o Acetato de Etila apresentou o maior percentual de teor lipídico (16,7 %), e o solvente com menor percentual de teor lipídico foi o hexano com 1,40 %. A maior eficiência do Acetato de etila, se deve a capacidade de extração de compostos polares presentes na biomassa de microalgas. A extração lipídica de *Chlorella vulgaris* com os diferentes solventes não foram conclusivas devido à baixa quantidade de biomassa da microalga obtida durante o processo de cultivo nesta etapa do experimento.

**Figura 12: Eficiência do solvente na extração de lipídeo da microalga de *Scenedesmus acuminatus*.**



Fonte: elaborado pelo autor

#### 5.4 Adição de nutrientes para melhorar o rendimento

Após a determinação da eficiência do solvente para a extração de lipídeos de microalgas, iniciou-se novo cultivo em escalas maiores. Inicialmente foi transferido 50 mL de microalgas *Chlorella vulgaris* pH 7 e 50 mL de microalgas *Scenedesmus acuminatus* em pH 8 para kitassato de 5000 mL. Após duas semanas foi observado o crescimento de colônias de microalgas nas condições ideais de cultivo, a Figura 13 representa o cultivo das microalgas dentro da incubadora.

**Figura 13. Cultivo de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acuminatus* em pH 7 e 8 respectivamente da esquerda para direita, capacidade de cultivo de 5 L.**

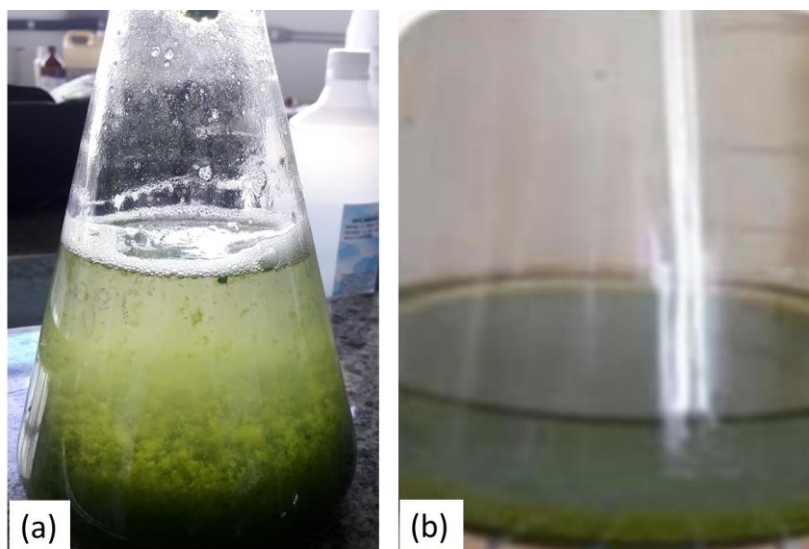


Fonte: elaborado pelo autor

Após o cultivo, foi realizado a centrifugação para obtenção da biomassa das microalgas, porém esse método não foi viável, devido ao volume de amostra. A filtração a vácuo da biomassa também não foi eficaz, uma vez que a microalgas passam pela malha do papel filtro, ocorrendo muita perda de biomassa.

Para tornar o método de separação mais eficiente, foi adicionado ao meio um agente floculante, sulfato de alumínio em solução, o uso de agente floculante permite que as microalgas em suspensão, sejam atraídas por forças de Van Der Waals e se aglutinem formando flocos maiores, que por diferença de densidade decantam por coagulação. O meio de cultivo permaneceu sob agitação por 30 minutos e em seguida, as amostras foram mantidas em repouso de 4 a 48 h até observar a total decantação da biomassa, a Figura 14 ilustra o processo de decantação após a floculação.

**Figura 14: Processo de decantação com agente flocculante. (a) Período de 4 h sobre ação do agente flocculante. (b) Decantação da biomassa após 48 h de repouso.**



Fonte: Elaborado pelo autor

Após a decantação da biomassa de microalgas foi realizada uma filtração simples com funil caseiro, conforme ilustrado na Figura 15. A retenção da biomassa no papel de filtro foi eficiente.

**Figura 15. Filtração simples da biomassa - lado esquerdo pH 7, lado direito pH 8.**



Fonte: Elaborado pelo autor

Após a filtração, a biomassa úmida foi armazenada em dessecador com sílica gel para retirar a umidade durante uma semana.

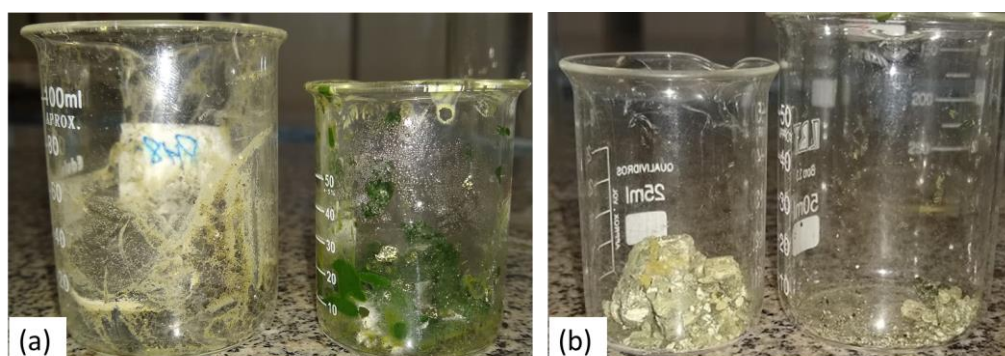
Para aumentar o rendimento da biomassa foi testado um cultivo com adição de fósforo, foi usado 5,0 mg de fosfato de cálcio para cada 1,0 L do meio de cultura. Os rendimentos da biomassa seca obtida após o cultivo com fósforo foram comparados com o cultivo sem fósforo, os valores da massa da biomassa seca estão representados na tabela 3 e podem ser observados na Figura 16.

**Tabela 3. Proporção de biomassa de microalga seca**

MEIO DE CULTURA	SEM FOSFATO DE CALCIO (g)	COM FOSFATO DE CALCIO (g)
pH 7	1,472	3,915
pH 8	1,370	3,810

Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 16. Biomassa seca após o cultivo. (a) Biomassa seca de *Scenedesmus acuminatus* em pH 7 sem adição de fósforo (à esquerda) e com fósforo (à direita). (b) Biomassa seca de *Chlorella vulgaris* em pH 8 com adição de fósforo (à esquerda) e com adição de fósforo (à direita)**



Fonte: Elaborado pelo autor

Com a adição do fósforo, foi possível observar um aumento de 60 % em média da biomassa seca no cultivo das duas espécies de microalgas, tornando satisfatório a utilização do fósforo como nutriente no meio de cultura em pH 7 e 8.

Segundo Becker (2008), o fósforo é o nutriente necessário para o crescimento normal das algas, pois é essencial para quase todos os processos celulares, tais como a biossíntese de ácidos nucleicos e a transferência de energia.

### 5.5 Pré-tratamento da biomassa-por Bead Mill e extração dos lipídeos por shoxlet

Para determinar a eficiência do pré-tratamento de Bead Mill (BM), houve comparação do teor lipídico obtido por extração em Soxhlet a partir de amostras de biomassa seca de microalgas com e sem o pré-tratamento por Bead Mill. As amostras foram mantidas em refluxo de 3 a 5 horas em Acetato de Etila, e os valores obtidos foram comparados na tabela 4.

**Tabela 4. Teor lipídico da extração de microalgas com e sem Bead Mill**

Microalgas	(%) lipídeos da Extração com B.M.	(%) lipídeos da Extração sem B.M.
<i>Chlorella vulgaris</i>	19,95	12,30
<i>Scenedesmus acuminatis</i>	11,75	4,62

Fonte: Elaborado pelo autor

O rendimento do teor lipídico das microalgas com biomassa submetida ao pré-tratamento BM foi significativamente maior. Através dos resultados apresentados na tabela 4 foi possível observar um aumento de 38 % no teor lipídico da microalga *Chlorella vulgaris* e de 60 % em *Scenedesmus acuminatus*. Esse aumento no rendimento está relacionado com a ruptura das paredes celulares das microalgas, expondo o conteúdo lipídico do interior da célula, facilitando a extração com os solventes orgânicos utilizados no processo.

Para determinar o rendimento dos lipídeos foi utilizado a Equação 1 (página 32). O teor lipídico das microalgas pode variar muito, girando entre de 5 a 77 %, mas níveis lipídicos de 20 a 50 % são bastante comuns de serem obtidos (ZORN, *et al.*, 2017). Segundo Phukan *et al* (2011), a composição de lipídeos da *Chlorella vulgaris* é de 14-22 %, sendo obtidos valores bem próximos (19,95 %), conforme demonstrado na tabela 5. Segundo De Brito *et al* (2020), a *Scenedesmus* apresenta potencial para a produção de biocombustíveis devido à sua elevada atividade metabólica, podendo produzir de 10 a 25 % de óleo. O resultado de 11,75 % de óleo obtido neste trabalho confirma o valor estimado pelo autor.

## 5.6 Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas obtidos por Cromatografia Gasosa

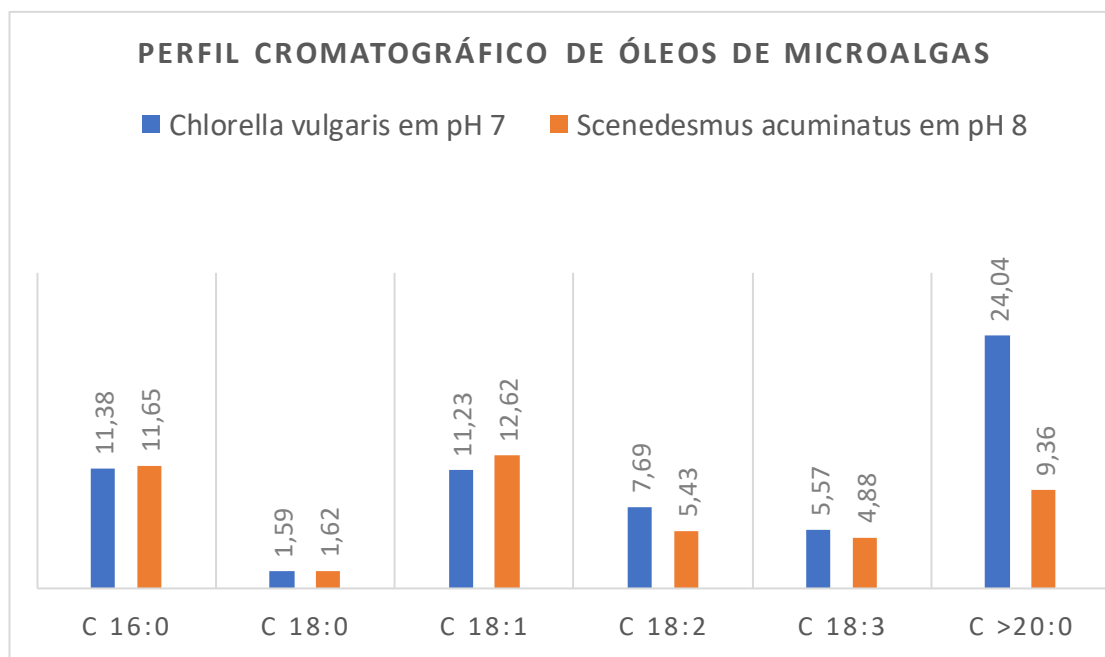
A análise cromatográfica das amostras de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acuminatus* apresentaram perfis de ácidos graxos semelhantes. O tempo de retenção ( $T_R$ ) é o tempo necessário após a injeção da mistura na coluna até aquele componente alcançar o detector das amostras esterificadas dos lipídeos de microalgas e foi comparado com o  $T_R$  de ésteres de ácidos graxos presentes numa amostra de biodiesel metílico de soja usado como padrão para identificação da cadeia carbônica (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C>20:0) (Tabela 5). A Norma BS EM 14103:2011 também foi utilizada como referência para comparação dos resultados obtidos. A Figura 17 representa o gráfico com o perfil cromatográfico e com os percentuais dos ésteres de ácido graxo de microalgas.

**Tabela 5. Tempo de retenção de ésteres de ácidos graxos de Biodiesel de soja (Padrão).**

<b>Ésteres de Ácidos Graxos</b>	<b>Tempo de Retenção (<math>T_R</math>)</b>
<b>Pamitato (C16:0)</b>	16.13
<b>Estearato (C18:0)</b>	18.20
<b>Oleato (9-C18:1)</b>	18.40
<b>Linoleato (9,12-C18:2)</b>	18.95
<b>Linolenato (9,12,15-C18:3)</b>	19.71
<b>Araquidato (C <math>\geq</math>20:0)</b>	20.63

Fonte: Elaborado pelo autor

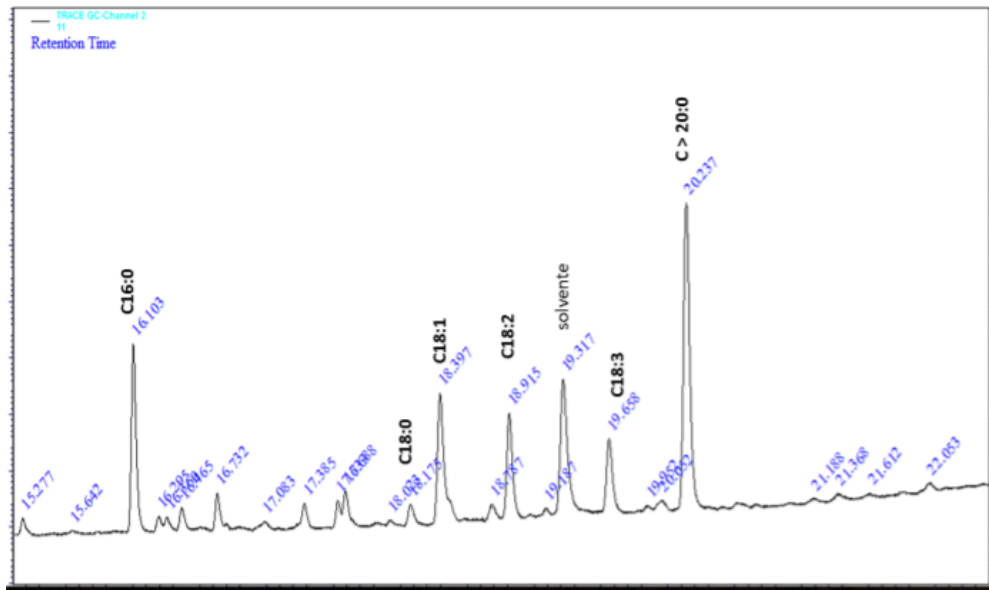
**Figura 17. Gráfico do Perfil cromatográfico de ácidos graxos das microalgas.**



Fonte: Elaborado pelo Autor

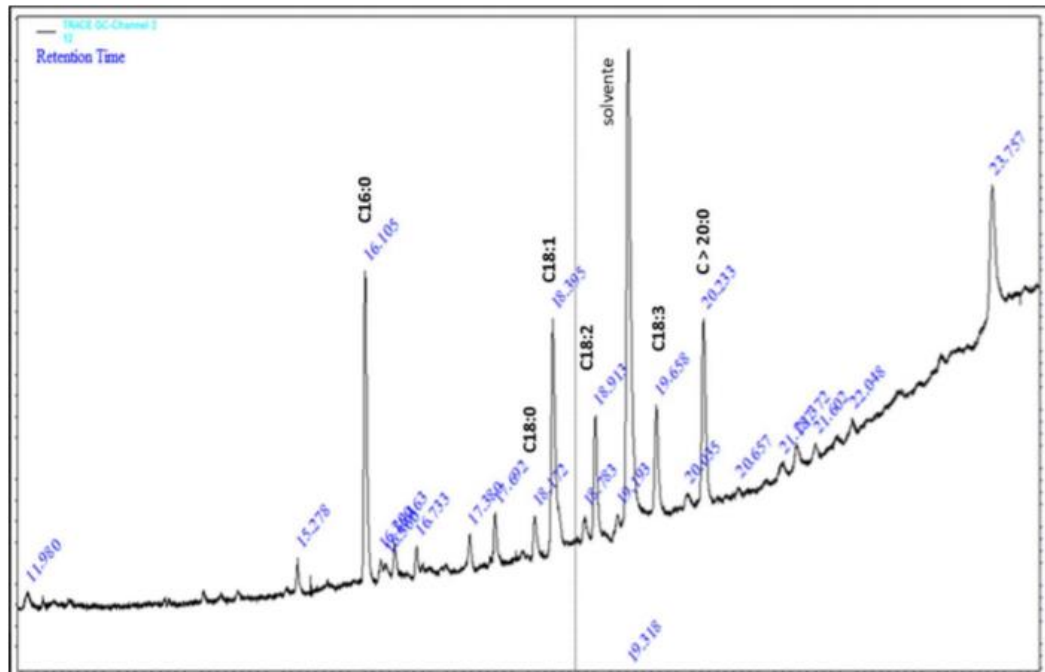
Os resultados obtidos da amostra de *Chlorella vulgaris* cultivado em pH 7, indicam o perfil cromatográfico de predominância dos teores de ácidos graxos saturados (C16:0 e C  $\geq$  20:0) com percentual 11,38 e 24,04 % respectivamente, já a amostra de *Scenedesmus acuminatus*, cultivada em pH 8 apresentaram percentuais de ácidos graxos de insaturado de ácido oleico (C18:1) com 12,62 % e ácidos graxos saturados em (C16:0 e C>20) de 11,65 % e 9,36 %. As Figuras 18 e 19 apresentam o cromatograma dos lipídeos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acuminatus*.

Figura 18 Cromatogramas dos ésteres de ácidos graxos de microalgas *Chlorella vulgaris*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 19. Cromatogramas dos ésteres de ácidos graxos de microalgas *Scenedesmus acuminatus*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme pode ser visto na Figura 18, o perfil de ácidos graxos de *Chlorella vulgaris* sob as condições de cultivo mencionadas, apresenta baixos percentuais de ácidos graxos insaturados oleicos (C18:1), linoleicos (C18:2), e  $\alpha$ -linolênicos (C18:3), e um maior percentual de

carbonos saturados de ácidos de Araquidato (C>20, 24,04%) e ácido palmítico (C16:0, 11,65%). A alta concentração de carbonos saturados confere a esse lipídeo maior estabilidade oxidativa, favorecendo o uso desse óleo para a produção de biodiesel.

A Figura 19 representa o perfil cromatográfico da microalga *Scenedesmus acuminatus*, com o melhor resultado de um monoinsaturado (C18:1) com 12,62 %. Este percentual somado aos outros óleos insaturados (C18:2) e (C18:3), representa um total de 23 % de óleos insaturados. As insaturações melhoram a operabilidade do biodiesel em baixas temperaturas, mas sua resistência à oxidação diminui. Em comparação, o óleo da microalga *Scenedesmus acuminatus* apresentou maior teor de ácidos graxos insaturados. Essa diferença, junto com o maior teor lipídico, favorece a seleção desta espécie para a produção de biodiesel mais apropriado para regiões frias.

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível realizar o cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acuminatus* em laboratório com boa adaptação, sendo de fundamental importância o controle das condições ambientais: fotoperíodo, pH 7 e 8, temperatura 25°C e aeração 3,2 L/ min. A técnica de semeadura por esgotamento obteve melhor resultado, proporcionando a predominância das espécies *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acuminatus*. Considerando-se o pH como um fator seletivo para o desenvolvimento das microalgas, foi possível determinar que para a microalga *Chlorella vulgaris*, o desenvolvimento em pH 7 é ideal, e para a microalga *Scenedesmus acuminatus*, o ideal é o desenvolvimento em pH 8 maior.

A produtividade das microalgas foi aumentada satisfatoriamente com adição de fosfato de cálcio, um nutriente importante para o desenvolvimento das microalgas, pois tem forte influência em seu metabolismo, sendo, portanto, viável a sua utilização para melhorar o rendimento da biomassa. O processo de separação com agente floculante também se mostrou satisfatório, promovendo a decantação total das microalgas e possibilitando a filtração sem grandes perdas.

O estudo da eficiência dos solventes no processo de extração possibilitou definir a polaridade dos compostos presentes nas frações lipídicas, sendo o maior percentual de teor lipídico de 16,7 %, utilizando o Acetato de Etila, e o menor percentual de teor lipídico de 1,40 % com o uso do hexano. O uso de Acetato de etila proporcionou uma extração de compostos de caráter mais polar presentes na biomassa de microalgas.

Foi possível observar um aumento significativo no teor de lipídeos das amostras submetidas ao pré-tratamento BM. Obtivemos 38 % a mais de teor lipídico da microalga *Chlorella vulgaris* e 60 % de *Scenedesmus acuminatus*, devido à facilitação da extração com os solventes orgânicos utilizados no processo.

A extração dos lipídeos por Soxhlet, solvente orgânico e posterior determinação do perfil de ésteres de ácidos graxos por meio de análises de cromatografia gasosa, determinou o perfil e o percentual de ácidos graxos presentes nas microalgas. identificamos os ácidos Palmítico (C16:0), Esteárico (C18:0) Oleico (C18:1), Linoleico (C18:2), Linolênico (C18:3) e Araquídico (C>20:0). Análise cromatográfica mostrou que as microalgas possuem potencial para produção biodiesel com características distintas.

O biodiesel produzido a partir de microalgas *Chlorella vulgaris* poderá apresentar uma maior concentração de ácidos graxos saturados, possuindo maior estabilidade oxidativa, já o biodiesel produzido a partir de *Scenedesmus acuminatus*, poderá apresentar maior tole-

rância a temperaturas mais baixas, devido à sua maior concentração de ácidos graxos insaturados. Este biodiesel poderá ser utilizado em regiões mais frias, como no Sul do Brasil.

## REFERÊNCIAS

ABALDE, J. et al. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. España: Universidade da Coruña. Monografías n.26, 210, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução ANP N° 791, DE 12.6.2019**. [S. l.], 2019. Disponível em: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resolanp/2019/junho&item=ranp-791-2019&export=pdf>. Acesso em: 10 jul. 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. ANP (2018a). **Resolução ANP n° 758/2018**. Regulamenta a certificação da produção ou importação eficiente de biocombustíveis de que trata o art. 18 da Lei n° 13.576, de 26 de dezembro de 2017, e o credenciamento de firmas inspetoras. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Rio de Janeiro. Acesso em 23 de novembro de 2018, disponível em <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2018/novembro&item=ranp-758-2018>.

ANDRADE, Lidiane Maria de. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição proteica e lipídica via espectrometria de massas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

ARAÚJO, Francisca Pereira *et al.* Estudo da viabilidade de microalgas para produção de biodiesel. VII CONEPI. Piauí, 2012.

AZEREDO, Vinícius Barbosa Salles. **Produção de Biodiesel a partir do Cultivo de Microalgas: Estimativa Preliminar de Custos e Perspectivas para o Brasil**. Dissertação de Mestrado. UFRJ/COPPE, 2012.

AZEVEDO, Andréa Tucci Maria Teresa de P., *et al.* **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras**. Editora: Instituto de Botânica - Núcleo de Pesquisa em Ficologia. Editora: Célia Leite Sant'Anna. ISBN: 978-85-7523040-4. Projeto: Biodiversidade de algas e cianobactérias do Pantanal, 2012.

BASOVA, M.M. **Composição de ácidos graxos de lipídios em microalgas**. *Int. J. Algae*, 7, 33– 57, 2005.

BECKER, E. W. **Microalgas: Biotecnologia e Microbiologia**. Por Cambridge: Cambridge University Press, p. 230, 1994. £40.00, US\$ 69,95. ISBN 0-521-35020-4. Publicado online pela Cambridge University Press: 03 de outubro de 2008.

BIODISELBR. [Retrospectiva 2007 | BiodieselBR.com](#)

BRAZACA, Solange. Determinação De Lipídeos. **Departamento De Agroindústria, Alimentos E Nutrição – Esalq/Usf Laboratório De Análise De Alimentos E Nutrição**, [S. l.], p. 1-5, 30 abr. 2016. Disponível em: [https://edisciplinas.usf.br/pluginfile.php/1061690/mod\\_resource/content/1/Aula\\_6\\_Determinacao\\_Lipideos\\_Solange.pdf](https://edisciplinas.usf.br/pluginfile.php/1061690/mod_resource/content/1/Aula_6_Determinacao_Lipideos_Solange.pdf). Acesso em: 27 abr. 2020.

BRANDALIZE, Marcus Vinicius *et al.* **Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom**. Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, p. 14754-14760, 2014.

BRUM, Aelson Aloir Santana *et al.* **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal**. Química Nova, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

CALFA, Bruno Abreu; TOREM, Maurício Leonardo. **Uso de Biomassas em Processo Combinado Biossorção/Flotação para Remoção de Metais Pesados**. Rio de Janeiro: Puc-Pontifícia Universidade Católica, 2007.

CARDOSO, Willian Acordi *et al.* **Comparação entre métodos de extração de óleo de microalgas**. Revista de Iniciação Científica, v. 12, n. 1, 2014.

CARDOSO, Aderlânio da Silva; VIEIRA, Gláucia Eliza Gama; MARQUES, Anelise Kappes. **O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis**. Revista Brasileira de Biociências, v. 9, n. 4, 2011.

CHIES, Vivian. **Microalgas para produção de biocombustíveis serão apresentadas na Agrishow**. Agroenergia Biodiversidade, [S. l.], p. 1-1, 23 abr. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2749249/microalgas-para--producao-de-biocombustiveis-serao-apresentadas-na-agrishow>. Acesso em: 19 ago. 2020.

CHISTI, Yusuf. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

COBELAS, M. A. and LECHADO, J. Z. **Lipids in Microalgae. A Review**. *Biochem Grasas y Aceites*, 40, 118-145, 1989.

COTTA, Jussara Aparecida Oliveira; REZENDE, Maria Olímpia Oliveira; LANDGRAF, Maria Diva. **Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados**. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2026-2033, 2009.

DE BRITO, Yohanna Jamilla Vilar *et al.* **Microalga *Scenedesmus acuminatus* em meios de cultivo visando à produção de biodiesel**. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 2020.

DE CASTRO, M.D. Luque, PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction: Past and present panacea**. *Journal of Chromatography A*. 2010.

DE OLIVEIRA, Lizandra Carla Pereira *et al.* **Estudo da extração e avaliação do rendimento de óleo de baru**. *Outubro*, v. 1, n. 1, 2011.

DIAS, Guilherme *et al.* **Biorremediação de efluentes por meio da aplicação de microalgas – uma revisão**. *Química Nova*. 2019.

EMBRAPA, Agroenergia. **Microalgas**. Ano IV, nº 10, dezembro de 2016.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **EPE (2016b)**. *Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2015*. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro. Fonte: [www.epe.gov.br](http://www.epe.gov.br)

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **EPE (2018a)**. *Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2017*. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro. Fonte: [www.epe.gov.br](http://www.epe.gov.br)

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

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Eds). Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum, p.29-60, 1975.

HADDAD, M.; FAWAZ, Z. **Evaluation of microalgae alternative jet fuel using the AHP.** Method with a Emphasis on the Environmental Progress & Sustainable Energy, v.32, n.3, 3044-3064, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ep.11638/abstract>>. Acesso em: 06 fev. 2013.doi:10.1002/ep.11638.

IGV BIOTECH. Acesso em: [File:Photobioreactor PBR 4000 G IGV Biotech.jpg - Wikimedia Commons](#).

JARENKOW, André. **Estudo da produção e extração de lipídeos na microalga Chlorella sp.** 2014.

LABORATÓRIO DE CULTIVO DE ALGAS (LCA). UFSC. Acesso em: <https://ufscsustentavel.ufsc.br/2018/05/08/ufsc-integra-rede-de-estudos-de-microalgas-para-producao-de-biodiesel/>.

MACÍAS-SÁNCHEZ, *et al.* **Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from Dunaliella salina.** Talanta, v. 77, Issue 3, p. 948-952, 2009.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. **Atividade antioxidativa de extratos de espécies selecionadas da família Lamiaceae em óleo de girassol.** Química alimentar, v 58, ed. 3, 245-248, 1997.

MARIANO, Vera Lucia Bellin. PROJETO PDE. **Cultivo de Microalgas em Fotobiorreatores.** Ibaiti - Paraná - Brasil - Idealizador do Projeto: André Bellin Mariano (UFPR). Acesso em: [Cultivo de Microalgas em Fotobiorreatores: Outubro 2011 \(microalgasprofessoravera.blogspot.com\)](#).

MARTINS, Marcio Arêdes *et al.* **NOTA TÉCNICA: AS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA À PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS.** Revista Engenharia na Agricultura-REVENG, v. 20, n. 5, p. 389-403, 2012.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, A Nídia. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, Portugal, v. 14, p. 217-232, 2009.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. MME. (2019c). Relatório de consolidação dos testes para validação da utilização de misturas com biodiesel B15 em motores e veículos. Grupo de trabalho para testes com o biodiesel. Acesso em 15 de maio de 2019, disponível em <http://www.mme.gov.br/documents/10584/0/Relatorio+B15+-+B20.pdf/>.

OSHE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E.; MENDES, L. S. B. **Revisão: Sequestro do carbono realizado por microalgas e floresta e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas.** Insula, v. 36, p. 39-74, 2007.

PEREIRA, Claudio MP *et al.* **Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas.** Química Nova, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PHUKAN, Mayur M., CHUTIA, Rahul S., KONWAR, B. K., KATAKI, R. **Microalgae Chlorella as a potential bio-energy feedstock.** Applied Energy, 88 (10), 3307-3312, 2011.

RAVEN, Peter. H. **Biologia vegetal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 728, 2001.

RAMLUCKAN, Krishan; MOODLEY, Kandasamy G.; BUX, Faizal. **An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from global algal biomass by the soxhlet extraction method.** Fuel, v. 116, 103-108, 2014.

SANTOS, Marta Moreira dos. **Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel.** Tese de Doutorado, 2014.

SINGH, Jasvinder P.; GU Sai. **Potencial de comercialização de microalgas para produção de biocombustíveis**. Revisões de energia renovável e sustentável. v 14, ed 9, 2596-2610, 2010.

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei D.; COLLA, Luciane Maria. **Aplicações ambientais de microalgas**. Revista CIATEC–UPF, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SCHNEIDER, Caroline Cassalha. **UTILIZAÇÃO DE ULTRASSOM EM QUÍMICA ORGÂNICA**. 2005. 75 p. Monografia (Bacharelado e Licenciatura em Química) Universidade Federal de Pelotas, [S. l.], 2005. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/wwverde/files/2014/12/Utiliza%C3%A7%C3%A3o-de-Ultrassom-em-Qu%C3%ADmica-Org%C3%A2nica.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2020.

SILVA, José William Alves da. **Fitorremediação de efluentes aquícolas e extração de lipídios para a produção de biodiesel utilizando a microalga *Chlorella vulgaris***. 2017.

SIERRA, José Jovanny Bermudez. **Extração de lipídios da microalga *Scenedesmus sp.* Com diferentes misturas de solventes orgânicos**. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA, v. 16, n. 2, p. 88-98, 2018.

SOUTO, Adriano Raush *et al.* **Microalgas de Águas Continentais: Produção de Biomassa e Coprodutos**. 2. ed. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2014. 487 p. v. 2. ISBN 978-85-8818-449-7. Disponível em: [http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/MicroalgasV2.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/MicroalgasV2.pdf). Acesso em: 20 abr. 2020.

WOJCIECHOWSKI, Juliana *et al.* **Manutenção das culturas: Condições gerais para a manutenção de microalgas em laboratório**. In: WOJCIECHOWSKI, Juliana *et al.* ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICROALGAS. [S.l.: s.n.], v. 1, cap. 3, p. 50-50, 2013.

ZORN, Savienne Maria Fiorentini Elerbrock *et al.* **Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídios da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* via solventes**. HOLOS, v. 2, p. 66-78, 2017.