

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

KEILLA SANTOS CERQUEIRA

PRODUÇÃO DA MICROALGA *SCENEDESMUS SP.* EM MANIPUEIRA PARA
EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

São Cristóvão (SE)

2019

KEILLA SANTOS CERQUEIRA

PRODUÇÃO DA MICROALGA *SCENEDESMUS SP.* EM MANIPUEIRA PARA
EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Roberto Rodrigues de Souza

Coorientadora: Jacqueline Rego da Silva Rodrigues

São Cristóvão (SE)

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C416p Cerqueira, Keilla Santos
Produção da microalga *scenedesmus sp.* em manipueira para
extração de lipídios / Keilla Santos Cerqueira ; orientador
Roberto Rodrigues de Souza - São Cristóvão, 2019.
100 f. : il.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Sergipe, 2019.

1. Engenharia química. 2. Algas. 3. Lipídios. 4. Mandioca. I.
Souza, Roberto Rodrigues de orient. II. Título.

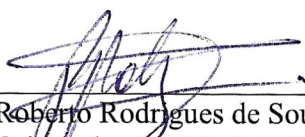
CDU 66.011

KEILLA SANTOS CERQUEIRA

**PRODUÇÃO DA MICROALGA *SCENEDESMUS SP.* EM MANIPUEIRA PARA
EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS**

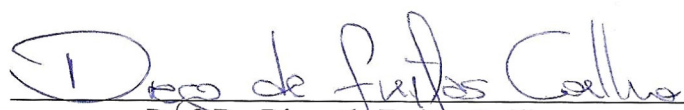
Dissertação aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe em 21 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Pro. Dr. Roberto Rodrigues de Souza
(Presidente – Orientador – DEQ & PEQ / UFS)


Profa. Dra. Jacqueline Rego da Silva Rodrigues
(Coorientadora – DEQ / UFS)


Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira
(Examinador – ITP / UNIT)


Prof. Dr. Diego de Freitas Coêlho
(Examinador – PEQ / UFS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades diárias de trabalhar, crescer e servir. Ao meu professor e orientador Roberto Rodrigues, que vem me acompanhando desde o início da minha graduação, pela oportunidade de aprender, por ter acreditado no meu trabalho e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação. A querida professora e Co orientadora Jacqueline Rego pela ajuda nos momentos em que mais precisei sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho. A todos os colegas de laboratório do LABAM, em especial Diego Coelho pela ajuda nos dias difíceis de experimento. Aos professores da Banca Examinadora pela disponibilidade de tempo e por terem aceitado o convite. À CAPES e CNq, pelo apoio financeiro. À minha amada família pela força, incentivo constante, amor incondicional e que sempre entenderam minha ausência, cujas raízes do amor vão além de qualquer limite.

Muito obrigada

RESUMO

Microalgas como a *Scenedesmus sp.* são fontes de energia renovável e têm sido estudadas para a obtenção de diversos bioprodutos, dentre os quais, destacam-se os lipídios, que podem ser aplicados no setor energético e alimentício. A produção de lipídios através das microalgas possui alguns gargalos, como a nutrição, forma de cultivo e a necessidade de realizar a quebra da estrutura celular; visto que o lipídio é um produto intracelular, além das dificuldades atreladas à extração e purificação. Diante dessa problemática ligada a nutrição microalgal e à recuperação do lipídio, o presente estudo busca analisar alguns fatores que influenciam nos processos de otimização o crescimento da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* em meio suplementado com manipueira - efluente líquido proveniente da prensagem da mandioca na produção de farinha, geralmente é descartada de forma concentrada, agredindo o meio ambiente, é um efluente rico em nutrientes e tem uma elevada carga orgânica, podendo assim fornecer para as microalgas complementação nutricional necessária para a produção de biomassa rica em lipídios com características semelhantes às dos óleos de plantas oleaginosas que produz biodiesel - em diferentes concentrações diluídos em meio sintético ASM-1, avaliando assim a densidade celular, condições de cultivo, biomassa seca e o conteúdo lipídico através do estudo da lise celular e formas de extração. A *Scenedesmus sp.* foi cultivada assepticamente durante 10 dias em diferentes ciclos de fotoperíodo, diferentes concentrações de nitrato e diferentes concentrações de fosfatos, à temperatura ambiente. Para a recuperação do lipídio, foram avaliados dois tipos de pré-tratamentos (ultrassom e autoclave) para realizar a quebra da molécula, dois sistemas de solventes (CE-Clorofórmio/etanol e CM-Clorofórmio/metanol) e dois métodos de extração Bligh and Dyer (1959) com ultrassom e Soxhlet. Desta forma a *Scenedesmus sp.* obteve sua maior concentração celular ($1,3 \text{ g.L}^{-1}$) e máximo teor lipídico (18,28 %) empregando-se 18h de exposição a luz, $39,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de fosfatos, 85 mg.L^{-1} de nitrato no sétimo dia de cultivo. Observou-se que para ambos os sistemas de solventes, o pré-tratamento com autoclave foi mais eficiente; entretanto, o método de Bligh and Dyer (1959) adaptado com o uso de ultrassom e sistemas de solventes clorofórmio/etanol obteve maior rendimento (19,27%) e baixo custo com energia térmica, quando comparado ao Soxhlet com mesmo o sistema de solvente que resultou em 15,71% de lipídeo totais extraídos. Nessas condições otimizadas os meios de cultivos suplementados com manipueira (5% - 10%) apresentaram melhor eficiência na produção de biomassa seca de microalgas em comparação ao meio de cultivo sintético. A análise do perfil lipídico sugere a possibilidade de utilizar o óleo da microalga para produção do biodiesel devido ao baixo teor de insaturação, menor que o de óleos vegetais (soja, algodão e canela).

PALAVRAS-CHAVE: microalgas; manipueira; extração de lipídios.

ABSTRACT

Microalgae such as *Scenedesmus sp.* are sources of renewable energy and have been studied for the production of several bioproducts, among which the lipids, which can be applied in the energy and food sector, stand out. The production of lipids through microalgae has some bottlenecks, such as nutrition, form of cultivation and the need to break the cell structure; since lipid is an intracellular product, in addition to the difficulties associated with extraction and purification. In view of this problem related to microalgal nutrition and lipid recovery, the present study aims to analyze some factors that influence the growth of the biomass of the microalga *Scenedesmus sp.* in a medium supplemented with manure - liquid effluent from the pressing of manioc in the production of flour, is generally discarded in a concentrated way, attacking the environment, it is a nutrient rich effluent and has a high organic load, being able to provide for the microalgae complementation nutritional balance required for the production of lipid-rich biomass with characteristics similar to those of oleaginous plant oils that produce biodiesel - in different concentrations diluted in ASM-1 synthetic medium, thus evaluating cell density, culture conditions, dry biomass and lipid content through the study of cell lysis and extraction forms. *Scenedesmus sp.* was grown aseptically for 10 days in different photoperiod cycles, different nitrate concentrations and different phosphate concentrations at room temperature. In order to recover lipid, two types of pre-treatments (ultrasonic and autoclave) were used to perform the breakdown of the molecule, two solvent systems (EC-Chloroform / ethanol and CM-Chloroform / methanol) and two extraction methods Bligh and Dyer (1959) with ultrasound and Soxhlet. In this way *Scenedesmus sp.* (1.3 gL^{-1}) and the highest lipid content (18.28%), using 18h of exposure to light, 39.75 mg.L^{-1} of phosphates, 85 mg.L^{-1} of nitrate on the seventh day of culture. It was observed that for both solvent systems, autoclave pretreatment was more efficient; however, the Bligh and Dyer (1959) method adapted with the use of ultrasound and chloroform / ethanol solvent systems obtained a higher yield (19.27%) and low thermal energy cost when compared to Soxhlet with the same solvent system which resulted in 15.71% total lipid extracted. Under these optimized conditions the culture media supplemented with manipueira (5% - 10%) presented better efficiency in the production of dry biomass of microalgae compared to the synthetic culture medium. The analysis of the lipid profile suggests the possibility of using microalgae oil to produce biodiesel due to the low unsaturation content, lower than that of vegetable oils (soybean, cotton and cinnamon).

KEYWORDS: microalgae; manipueira; lipid extraction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição proximal (g/100 g massa sólida) de algumas espécies de microalgas.	17
Tabela 2- Comparação da produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais	21
Tabela 3- comparação das propriedades do biodiesel de microalgas e diesel convencional com o padrão do método ASMT para biodiesel	22
Tabela 4 - Composição química de diferentes microalgas	26
Tabela 5 - Efeito das diferentes culturas no perfil graxo das microalgas.....	27
Tabela 6- Principais fatores físicos e nutritivos necessários ao cultivo das microalgas.....	27
Tabela 7 - Macronutrientes e suas respectivas fontes na natureza	28
Tabela 8 - Composição e quantidade das soluções estoques	38
Tabela 9 - Características químicas da manipueira.....	44
Tabela 10 - Composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator	51
Tabela 11 - Parâmetros quanto à polaridade para os solventes utilizados	51
Tabela 12 - Composição do óleo extraído de acordo com o solvente utilizado	52
Tabela 13 - Tabela de Solubilidade do clorofórmio, etanol e metanol.....	52
Tabela 14 - Procedimento de extração e rendimento de extração de algumas microalgas.....	56
Tabela 15- Composição do meio sintético ASM-1 padrão em (mg L ⁻¹)	61
Tabela 16 - Composição da manipueira utilizada neste trabalho	62
Tabela 17 - Diferentes concentrações de manipueira diluída em meio ASM-1 para cultivo da <i>Scenedesmus sp.</i> usando fotobiorreatores do tipo <i>Erlenmeyer</i>	63
Tabela 18 - Níveis de nitrato do meio ASM-1 em mg.L ⁻¹	64
Tabela 19 - Variação da concentração de nitrogênio do meio ASM-1 com o tempo.	64
Tabela 20 – Níveis de fosfato de cada meio em mg.L ⁻¹	65
Tabela 21 – Níveis de experimento	65
Tabela 22 - Fatores utilizados com base nos melhores resultados de Lee et al. (2010) e Zorn et al. (2017)	67
Tabela 23 - Parâmetros e métodos a serem utilizados na extração	67
Tabela 24 - Dados da extração baseada no método Bligh & Dyer (1959) com o uso do ultrassom e autoclave	80
Tabela 25 – Perfil de ácidos graxos da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada em meio sintético ASM-1 e em meio suplementado com manipueira a 5% e 10%.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais produtos alimentares incorporados com biomassa de microalgas.	19
Figura 2 – Efeito terapêutico dos alimentos funcionais desenvolvidos com biomassa de microalgas	19
Figura 3 – Prospecção da matriz energética no Brasil de 2010 a 2020.....	20
Figura 4 - Composição em ésteres graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados de alguns óleos e gorduras.....	23
Figura 5- Microalga <i>Scenedesmus</i> sp. vista no microscópio óptico.	25
Figura 6 - Influência da energia luminosa (E) na taxa fotossintética (F) e a eficiência da fotossíntese (F/E).	31
Figura 7- a) Fotobiorreatores de Sistema aberto – LCA/UFSC; b) Fotobiorreatores de Sistema Fechado .	35
Figura 8 - Tipos básicos de fotobiorreatores: a) tipo carrossel, vista superior, as partes escuras indicam palhetas; b) tipo plano, vista horizontal; c) com iluminação interna, os espaços em branco indicam iluminação interna; d) tipo serpentina; e) tipo tubular horizontal com sistema <i>airlift</i>	35
Figura 9 – Curva de crescimento de microalga.....	37
Figura 10 - Evolução da produção de mandioca nos principais países.	39
Figura 11 – Distribuição percentual de mandioca (t/ha) no território nacional safra 2017	40
Figura 12 – Monitoramento e diagnósticos do ano de 2017 da área plantada (ha) e produção em toneladas.....	41
Figura 13 - Persistência do cianeto na manipueira em função do tempo. Manipueira sem tratamento físico (a); Manipueira Filtrada (b); Manipueira Decantada por 24h (c); Manipueira Decantada por 24h e Filtrada (d); Manipueira Decantada por 24h, Filtrada e Centrifugada a 4.000 RPM / 10 minutos (e).	43
Figura 14 – Remoção de cianeto total em função do tempo (h) em temperaturas constantes.	44
Figura 15 - Comparação dos tipos de técnicas para o rompimento celular aplicado à microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	47
Figura 16 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A) antes do pré-tratamento com ultrassom a quente e (B) após o procedimento.....	50
Figura 17 - Concentração de lipídios e clorofila obtidas pela extração <i>Soxhlet</i> utilizando 13 solventes....	53
Figura 18 - Comparação dos melhores solventes em sistemas binários e suas respectivas porcentagens de lipídios e clorofila.....	54
Figura 19- Representação gráfica dos dados de Equilíbrio Líquido-Líquido para um sistema do tipo diagrama triângulo equilátero	58
Figura 20–Fluxograma detalhado do procedimento adotado para padronização do meio de cultura ASM-1.	66
Figura 21 – Fluxograma procedimento de extração pelo método de Bligh and Dyer (1959) e <i>Soxhlet</i>	68
Figura 22 - Fluxograma procedimento de separação das fases dos métodos de Bligh and Dyer (1959) e <i>Soxhlet</i>	69
Figura 23 – Fluxograma do procedimento de derivatização de óleos e gorduras.....	70
Figura 24 - Curva de crescimento da biomassa da <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio ASM-1.....	72
Figura 25 - Produtividade diária de biomassa seca em meio ASM-1.....	73

Figura 26 - Produção de biomassa seca ao final dos 10 dias de experimento.	75
Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta em função da luz, fosfato e biomassa de microalga.....	76
Figura 28 – Biorreator contendo manipueira em elevadas concentrações.	77
Figura 29 - Crescimento da microalga em concentração de biomassa seca 2ª etapa de experimento com meio ASM-1 e manipueira com diluição 5% (a) e 10% (b).	78
Figura 30 - Porcentagem de lipídios extraído da microalga com e sem o pré-tratamento pelo método de Soxhlet.....	79
Figura 31- Porcentagem de lipídios totais na biomassa microalga cultivada em meio ASM-1 e em manipueira.	81
Figura 32 - Composição de ácidos graxos da biomassa da espécie estudada cultivada em meio ASM-1. .	83
Figura 33 - Composição de ácidos graxos da biomassa da espécie estudada cultivada em meio suplementado com 5% de manipueira.	83
Figura 34 - Composição de ácidos graxos da biomassa da espécie estudada cultivada em meio suplementado com 10% de manipueira.	84
Figura 35 – Concentração dos ácidos graxos da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio sintético ASM-1 e em meio suplementado com 5% e 10% de manipueira.....	85

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	MICROALGA.....	16
2.1.1.	Microalga e alimentação	16
2.1.2.	Microalga e biodiesel	20
2.1.3.	Microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	25
2.2.	NUTRIÇÃO DAS ALGAS	26
2.3.	FATORES FÍSICOS.....	29
2.3.1.	Intensidade Luminosa e Tempo de Iluminação	30
2.3.2.	Temperatura.....	31
2.3.3.	pH	32
2.3.4.	Agitação	32
2.4.	CULTIVO	34
2.4.1.	Sistemas de cultivo	34
2.4.2.	Taxa de crescimento.....	37
2.4.3.	Meio sintético para o cultivo de microalgas	38
2.4.4.	Manipueira.....	39
2.5.	COLHEITA E BIOMASSA.....	45
2.6.	PRÉ-TRATAMENTO PARA EXTRAÇÃO	46
2.6.1.	Microondas	47
2.6.2.	Autoclave	48
2.6.3.	Ultrassom	48
2.7.	EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS	50
2.7.1.	Soxhlet.....	55
2.7.2.	Bligh and Dyer (1959)	56
3.	OBJETIVOS	60
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	60
3.1.2.	Objetivos específicos	60
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61

4.1.	MICROALGA	61
4.2.	MEIO DE CULTURA.....	61
4.2.1.	Meio ASM-1.....	61
4.2.2.	Meio com efluente da produção de farinha decantado	62
4.3.	CONDIÇÕES DE CULTIVO	63
4.3.1.	Meio ASM-1 com padronização de nitrogênio	64
4.3.2.	Meio ASM-1 com otimização de luz e fósforo.....	65
4.4.	EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS	66
4.5.	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO	69
4.5.1.	Derivatização de óleos vegetais e gorduras	69
4.5.2.	Análise cromatográfica	71
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.2.	CULTIVO DA MICROALGA EM MEIO ASM-1.....	72
5.2.1.	Produtividade biomassa seca	72
5.3.	DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE CULTIVO DAS MICROALGAS EM MEIO ASM-1 COM OTIMIZAÇÃO DE NITROGÊNIO	73
5.4.	DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE CULTIVO DAS MICROALGAS EM MEIO ASM-1 COM OTIMIZAÇÃO DE LUZ E FÓSFORO	75
5.4.1.	Otimização do meio de cultura sintético ASM-1.....	75
5.5.	CULTIVO EM MANIPUEIRA	77
5.5.1.	Cultivo em ASM-1 suplementado com manipueira.....	77
5.5.2.	Produção de biomassa	77
5.6.	OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS	78
5.6.1.	Comparação entre métodos de pré-tratamento para extração de lipídios da microalga	79
5.6.2.	Produção de lipídios.....	81
6.	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são caracterizadas como microrganismos fotossintéticos que combinam água, dióxido de carbono e luz solar para produzirem várias formas de energia (Bresolin et al., 2018). A estrutura unicelular das microalgas permite que elas convertam facilmente a energia solar em energia química, elas capturam CO₂ do ar utilizam como fonte de carbono em seu metabolismo. Para Bhalamurugan et al. (2018) essa conversão bioquímica está sendo aproveitada comercialmente para a obtenção de biomassa de microalgas e, conseqüentemente, de produtos de aplicação comercial.

Os principais requerimentos nutricionais das algas são: fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio, sódio, sulfato, potássio e outros microelementos. Diferentes meios de cultura têm sido desenvolvidos para diferentes espécies de algas, baseados nos requerimentos específicos de cada uma delas (Arenas et al., 2017).

Cada espécie de microalga possui a sua particularidade e requerimento de nutrientes. Pode-se afirmar que boa parte das microalgas podem utilizar como fonte de nutrientes as águas residuais ricas em matéria orgânica a ser degradada (Salama et al., 2017). Em linhas gerais, a interação entre diversos aspectos químicos, físicos e biológicos é o que determina o crescimento das microalgas (Fazal et al., 2018).

Para que as microalgas possam se desenvolver, é necessário que fatores classificados como físicos e nutritivos importantes ao seu desempenho celular e atividades metabólicas (Kadir et al., 2018). Alguns critérios destacam-se na escolha no processo de cultivo, dentre eles a taxa de crescimento, normalmente através do total de biomassa produzido; disponibilidade de nutrientes, em particular dióxido de carbono para realizar o sequestro de carbono; resistência as variações das condições do ambiente, tais como luz, temperatura e contaminação de outros microorganismos; facilidade na colheita de biomassa e tempo de descarga (Chew et al., 2017).

Para a biomassa de microalga ser economicamente viável como matéria-prima para a produção de biocombustíveis em relação às culturas tradicionais é necessário aumentar a produtividade da biomassa e o teor de lipídeos e reduzir os custos dos insumos utilizados no preparo do meio de cultivo. Para isso a produção de biomassa de microalgas também pode ser realizada em

meios de cultura alternativos, entre os quais é possível destacar: esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores, lodo digerido, vinhaça de cana-de-açúcar, manipueira da farinha de mandioca, águas residuais da produção de azeite de oliva e resíduos da suinocultura (Neves, 2016).

Sergipe por ser um dos maiores produtores de farinha de mandioca da região (de OLIVEIRA et al., 2018) possui também grande quantidade de resíduo sendo despejado, pelos produtores, de forma concentrada e em grande quantidade à céu aberto agredindo o ambiente com elevada carga de matérias orgânicas e ácido cianídrico.

Durante as etapas de processamento da mandioca, são gerados efluentes (resultantes da água de lavagem das raízes e da água de prensagem da mandioca, esta última comumente denominada manipueira). Estão presentes nesse efluentes, nutrientes como açúcares (sacarose, glucose, frutose e maltose), nitrogênio, potássio, sais minerais, glicosídeos.

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas utilizando efluente de manipueira baseia-se primeiramente na produção elevada de biomassa. Para a produção de biodiesel, necessita-se ainda que esta biomassa apresente elevados percentuais de lipídios. A acumulação de lipídios nas microalgas é atribuída ao consumo de açúcares a uma taxa maior do que a taxa de geração celular, o que promove a conversão do excesso de açúcar em lipídios (Richmond, 2017b). A utilização de efluente é justamente para minimizar os custos com meio sintético e utilizar os nutrientes já disponíveis de um efluente contaminante em potencial.

A *Scenedesmus* sp. é uma microalga de rápido crescimento e alta capacidade de adaptação quanto às condições de cultivo, desta forma utilizam diversas fontes de nitrogênio e podem crescer num intervalo de temperatura entre 15 e 40°C (Chew et al., 2018). Essa facilidade de cultivo e manuseio impulsiona a aplicação industrial desse tipo de microalga tanto no setor de alimentos quanto no setor de combustíveis. Elas podem acumular quantidades substanciais de lipídios (aproximadamente 20-50% de peso seco) (Omirou et al., 2018). O teor de lipídeos da microalga *Scenedesmus* sp. varia de 11 a 20%, quando cultivada sob condições padrão, e pode chegar a 70% quando o meio de cultivo é otimizado (Fernandes et al., 2017).

Apesar dos valores expressivos no percentual de lipídeos de várias microalgas, é possível aumentar estes valores a fim de auxiliar a viabilização econômica da produção de biodiesel a partir

do óleo de microalgas (Pandey et al., 2018). Este resultado pode ser obtido através da aplicação de condições de *stress* (deficiência de nutrientes, anaerobiose, temperaturas extremas) na fase de crescimento da biomassa microalgal (Bajguz, 2019).

Essa acumulação de lipídios está atrelada a obtenção da biomassa seca, já que eles são produtos intracelulares e para o acesso é necessário um processo conhecido como ruptura celular ou lise celular. O rompimento celular constitui a primeira etapa na separação dos produtos intracelulares (Aguzzi and Altmeyer, 2016), envolve a liberação de compostos intracelulares através da aplicação de diversos métodos, como: ultrassom, tratamentos abrasivos como moagem, tratamento químico, congelamento, variação na pressão osmótica, micro-ondas, autoclavagem, dentre outros.

Mesmo existindo vários métodos específicos de rompimento químico e enzimático, são os métodos mecânicos que têm encontrado aplicação nas escalas piloto e industrial (Gröger, 2016). A eficiência de um método de rompimento é, geralmente, avaliada por seu grau de rompimento das células e em que tempo se consegue esse rompimento (Leitão, 2017).

O processo de lise celular é fundamental para otimizar a recuperação do lipídio no processo de extração, que é iniciado logo após essa ruptura celular. Na extração lipídica das microalgas são usados vários processos para aumentar a eficiência e o rendimento, com baixo custo. O óleo pode ser extraído por processos químicos, no qual solventes como benzeno, éter ou hexano são usados para promover a extração de lipídios. O uso de enzimas é outro método de extração eficaz, que torna o fracionamento do óleo mais fácil (Franco et al., 2013). Para Aenehvan et al. (2016) o método mais eficiente e aplicado trata-se da extração com solvente, tendo com fator determinante o tipo de sistema de solvente a ser utilizado. Os lipídios obtidos através da biomassa microalgal possuem uma composição mista de ácidos graxos quanto à polaridade, logo, é recomendada a utilização de um sistema formado por mais de um solvente, polar e apolar (de Jesus et al., 2018).

De uma forma geral, dentre os principais fatores que influenciam na extração de lipídios estão a eficiência da lise celular, o volume total e proporção de solventes polares/apolares contido no sistema e o tipo de contato entre o fluido e a biomassa. As microalgas foram consideradas como

uma das matérias-primas de biocombustíveis mais promissoras que podem enfrentar os desafios da segurança energética e da proteção ambiental (Wang et al., 2018).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICROALGA

As microalgas consistem em uma variedade de organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos, que vivem individualmente, em cadeia ou em grupos e que formam a base da cadeia alimentar nos oceanos e rios (da Silva Cardoso et al., 2011). São caracterizadas como microrganismos fotossintéticos, realizam fotossíntese através de sistemas e organelas contendo a clorofila, que combinam água e dióxido de carbono com a luz solar para produzirem várias formas de energia (Bresolin et al., 2018). A fotossíntese é um processo físico-químico, a nível celular, realizado pelos seres vivos clorofilados, que utilizam dióxido de carbono e água, para obter glicose através da energia da luz (Yahia et al., 2019).

As microalgas têm um requerimento nutricional relativamente simples e cuja biomassa pode ser empregada para obtenção de biocompostos como suplemento alimentar humano, alimento animal ou fonte de biocombustíveis (Andrade and Costa, 2008). O método biológico das microalgas é considerado uma das abordagens mais eficazes e amigas do ambiente para a fixação do CO₂ das correntes gasosas, são um grupo que suportam até 50% de CO₂, bem como outros compostos como óxido nítrico (NO) e dióxido de enxofre (SO₂) (Bresolin et al., 2018).

2.1.1. Microalga e alimentação

A utilização de microalgas como alimento por povos nativos já ocorria há séculos, destacando-se algumas espécies do gênero *Nostoc*, consumida na Ásia, e *Spirulina* consumida na África pelos *Kanembous* e no México pelos Astecas. As mulheres *Kanembous* colhiam a *Spirulina* no lago *Chad*, África, quando os ventos empurravam e aglomeravam as algas nas margens. Secavam a biomassa ao sol e, posteriormente, a amassavam com as mãos para moldar em blocos que cortavam em pequenos tabletes. Também preparavam o *dihé*, mistura de *Spirulina* com molho de tomate e temperos variados. Os Astecas colhiam *Spirulina* no Lago *Texcoco*, México, e a consumiam habitualmente com cereais sob a forma de molho conhecido como *chimolli* ou molho asteca (Aaronson et al., 1980, Shelef and Soeder, 1980, Ciferri and Tiboni, 1985, Drew and Flickinger, 1999). Entretanto, o cultivo de microalgas despertou forte interesse há apenas algumas décadas. Durante o século XX, pesquisadores e produtores comerciais desenvolveram diversas

tecnologias de cultivo para produzir biomassa de microalgas em tanques abertos e em fotobiorreatores fechados (Apt and Behrens, 1999, Drew and Flickinger, 1999).

A indústria global de alimentos vem explorando amplamente a utilização das microalgas como fonte promissora para novos alimentos, tão quanto para produtos alimentares funcionais. As mais utilizadas comercialmente são as *Chlorella* e *Spirulina*; além dessas, a *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Scenedesmus*, *Aphanizomenon*, *Odontella* e *Porfirídio* estão ganhando aceitação no mercado de alimentos saudáveis (Almeida et al., 2017). A composição de nutrientes de microalgas geralmente é composta de: proteínas (40% a 70%), glicídios (12% a 30%), lipídios (4% a 20%), caroteno (8% a 14%) e vitaminas (Becker, 2007) como mostra a Tabela 1. Nota-se que a alta quantidade e qualidade da proteína competem favoravelmente com outras fontes convencionais como soja e ovos, tornando as microalgas uma fonte promissora de proteína (Batista et al., 2013, Graziani et al., 2013). No entanto a quantidade desse nutriente pode variar conforme alguns fatores, como o tipo e espécie, fase de crescimento, qualidade do meio e da luz (Fontes et al., 1987, Miranda, 1997).

Tabela 1 - Composição proximal (g/100 g massa sólida) de algumas espécies de microalgas.

Microalga	Proteína	Hidratos de carbonos totais	Fibras	Lipídios
<i>Arthrospira platensis</i>	60,3-65,8	16,8-22,0	0,50-1,80	1,80-7,30
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62,0	23,0	ND	3,00
<i>Chlorella vulgaris</i>	41,0-58,0	12,0-29,8	0,40-14,4	10,0-34,8
<i>Diacronema vlkianum</i>	57,0	32,0	ND	6,0
<i>Dunaliella bioculata</i>	49,0	4,00	ND	8,00
<i>Dunaliella salina</i>	39,0-61,0	14,0-32,0	ND	14,0-20,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	29,0	14,0	ND	11,0
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48,0	27,0	ND	15,0
<i>Isochrysis</i> sp.	27,0-45,4	13,3-18,0	< 18,0	17,2-27,3
<i>Micractinium reisseri</i>	14,6	30,1	10,7	32,3
<i>Nannochloris bacillaris</i>	13,8	27,2	25,9	35,4
<i>Nannochloropsis granulata</i>	35,0	14,9	ND	28,5
<i>Porphyridium</i> sp.	29,7-38,5	26,5-57,0	0,30-0,50	6,10-14,0
<i>Scenedesmus</i> sp.	28,5	36,4	27,7	11,5
<i>Schizochytrium</i> sp.	12,1	32,0	0,60	38,0-71,1
<i>Spyrogira</i> sp.	6,00-20	33,0-64,0	ND	11,0-21,0
<i>Spirulina maxima</i>	60,0-71,0	8,00-16,0	ND	4,00-9,00
<i>Tetracystis</i> sp.	13,2	27,7	26,2	36,1

Fonte: Anele et al. (2016) Madeira et al. (2017)

A principal aplicação da biotecnologia das microalgas consiste na produção de suplementos alimentares. Entretanto, a aplicação com o objetivo de produzir esses suplementos e

de extrair substâncias com valor comercial restringe-se principalmente a poucas espécies dos gêneros *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella* e *Dunaliella* (Becker, 2007).

O gênero *Chlorella* é estudado para suplementação proteica, por apresentar de 41-58% de proteínas em sua composição (da Silva Cardoso et al., 2011), o gênero *Prototheca*, particularmente a espécie *Prototheca moriformis*, pode ser utilizado na alimentação de ruminantes após retirada de óleo, em associação com casca de soja, substituindo parcialmente o milho moído como fonte de carboidratos não-fibrosos (Stokes et al., 2015, da Silva et al., 2016).

Microalgas do gênero *Spirulina*, pertencentes ao grupo de cianobactérias, são as mais utilizadas na alimentação animal como fonte proteica, por apresentarem proteína de alto valor biológico e digestibilidade (Kulpys et al., 2009). Já o gênero *Nannochloropsis* representa uma classe de microalgas eucariontes também utilizada como fonte alternativa de proteína, comercializada em associação com *Chlorella* sp. (Stamm, 2015).

Atualmente, na Europa, as únicas microalgas registradas para uso na alimentação animal são *Spirulina máxima*, *Spirulina platensis* e *Schizochytrium* sp., para a nutrição de animais aquáticos (Altomonte et al., 2018).

Almeida et al. (2017) em seu estudo atual sobre produtos alimentares incorporados de biomassa de microalgas em patentes mostrou os tipos de produto alimentar desenvolvidos com a aplicação de biomassa de algas comestíveis, Figura 1. Ele verificou que os alimentos instantâneos e os alimentos funcionais são os mais prevalentes entre as patentes analisadas, geralmente esses alimentos são apresentados em formas de pós para serem dissolvidos em água ou outras bebidas. Gouveia et al. (2007) relata a inclusão da biomassa de microalgas como um pigmento e ingrediente funcional em produtos alimentares.

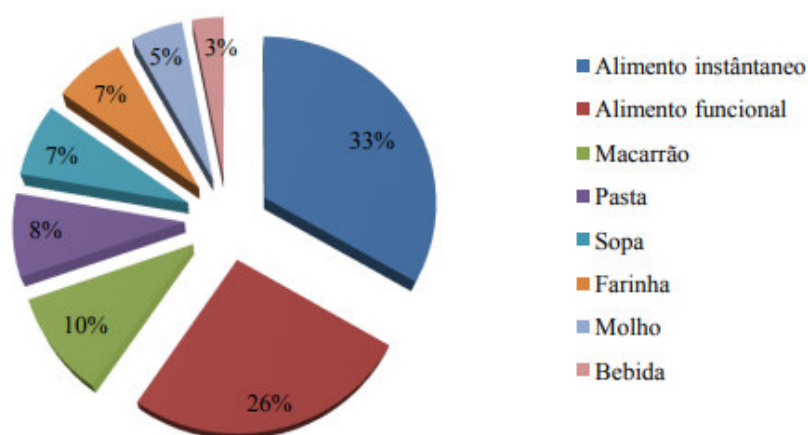


Figura 1 – Principais produtos alimentares incorporados com biomassa de microalgas.
Fonte: Almeida et al. (2017)

Em relação ao efeito terapêutico associado aos alimentos funcionais encontrados nas patentes analisadas por Almeida et al. (2017) na Figura 2, destacam-se alimentos com efeito para redução de peso, seguido do efeito protetor contra a hiperglicemia. Estudos científicos evidenciam importantes efeitos terapêuticos provenientes do consumo de biomassa de microalgas, como: anticancerígeno, hipolipidêmico, proteção contra diabetes e obesidade (Kurd and Samavati, 2015, Ponce-Canchihuamán et al., 2010).

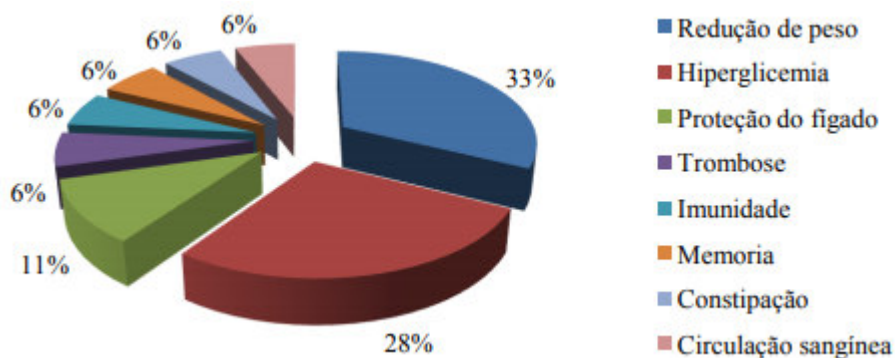


Figura 2 – Efeito terapêutico dos alimentos funcionais desenvolvidos com biomassa de microalgas
Fonte: Almeida et al. (2017)

Existem evidências de que a ingestão de pequenas quantidades de biomassa da microalga da *Scenedesmus* pode afetar de forma positiva a fisiologia de animais, apresentando resposta imune não-específica e auxiliando o sistema imunológico (Belay et al., 1993). No entanto, apesar de seu potencial há poucas pesquisas sobre o efeito do uso dessas microalgas como um suplemento alimentar.

2.1.2. Microalga e biodiesel

A preocupação com questões ambientais tem se tornado cada vez mais evidentes, isto porque os processos produtivos da atualidade exploram demasiadamente os recursos naturais, provocando danos ao meio ambiente e a escassez desses recursos (Barcellos et al., 2009, Araújo et al., 2012). O setor energético é um dos que mais demandam recursos naturais, o mundo possui uma matriz energética composta, principalmente, de fontes não renováveis como carvão, petróleo e gás natural, Tolmasquim (2012) fez uma prospecção da matriz energética do Brasil na Figura 3. Diante desse cenário, é de suma importância que se busque a diversificação da matriz energética mundial por meio do uso de fontes renováveis de geração de energia ou através de processos que aliem o desenvolvimento econômico com a proteção ambiental (Schmitz et al., 2012). 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).

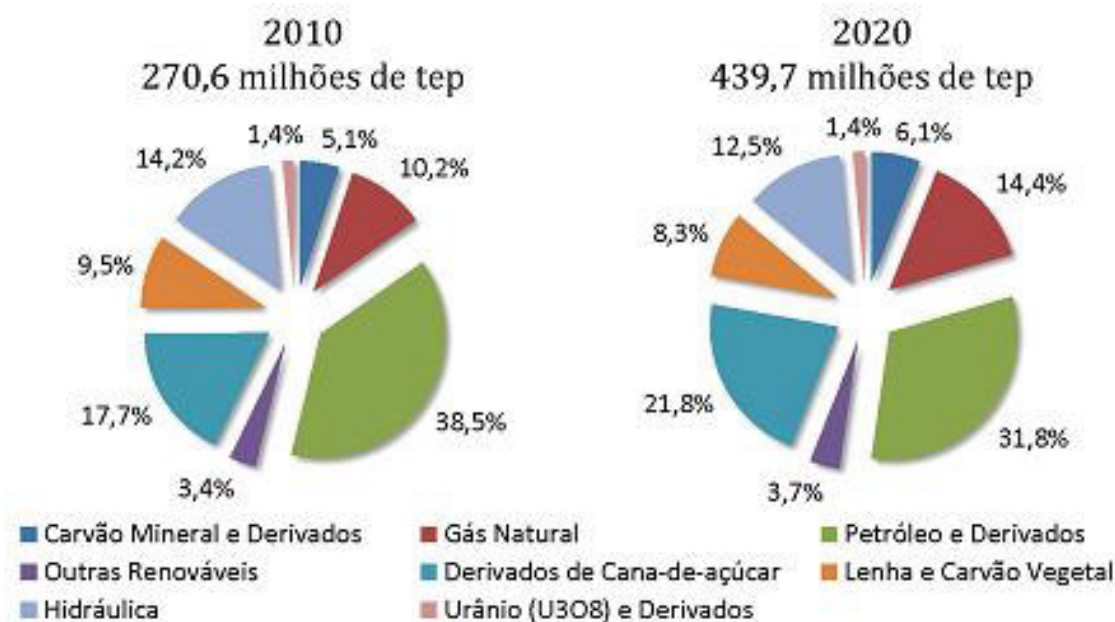


Figura 3 – Prospecção da matriz energética no Brasil de 2010 a 2020.

Fonte: Tolmasquim (2012)

Entre as possibilidades para a produção de biocombustíveis, estão as microalgas. Segundo Scott et al. (2010), o acúmulo de lipídios em microalgas para a produção de biodiesel tem sido um

dos focos de trabalhos de inúmeros pesquisadores em todo o mundo. A utilização dos lipídios das microalgas apresenta vantagens em comparação à fontes convencionais de lipídios, tais como a elevada produtividade de lipídios por área cultivada, em comparação com culturas oleaginosas agriculturáveis (As microalgas são as plantas de rápido crescimento, cerca de 10 a 50 vezes mais rápido que as plantas terrestres, com alta taxa de fixação de CO₂ (Ho et al., 2012)); capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídios neutros; elevada taxa de crescimento; crescimento em ambientes inóspitos, os quais não são agriculturáveis; utilização de fontes de nutrientes sintéticas e naturais; sequestro de CO₂ resultante do processo da fotossíntese do meio; produção de coprodutos de elevado valor agregado; crescimento em fotobiorreatores durante todo o ano com uma produção anual de biomassa com produtividade, com base na superfície, superior ao dos ecossistemas terrestres cerca de dez vezes. Na Tabela 2 são apresentados dados que comparam a quantidade de óleo sobre o peso seco e o rendimento de óleo por hectare por ano bem como a produtividade de biodiesel por área de cultivo.

Tabela 2- Comparação da produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais

Oleaginosa	Óleo (%)	Rend. de óleo (L óleo/ha ano)	Área necessária (m ² ano/kg biodiesel)	Produtividade de biodiesel (kg biodiesel/ha ano)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Maconha (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1307	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1070	9	1156
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58,700	0,2	51,927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97,800	0,1	86,515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136,900	0,1	121,104

FONTE: (Richmond, 2017a) (Chisti, 2007)

A colheita da biomassa das microalgas não segue um regime de safras, pode ser realizada diariamente, pois tem um tempo de geração de poucas horas, o que permite cultivos contínuos. Para o cultivo deste tipo de matéria-prima não são necessárias áreas aráveis ou água potável, não competindo, portanto, com a agricultura, animais ou pessoas (Chisti, 2007).

Quanto ao biodiesel sua qualidade pode sofrer variações conforme as estruturas moleculares dos seus ésteres constituintes ou devido à presença de contaminantes oriundos da

matéria prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem do biodiesel (Fernandes, 2016). Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, objetivando fixar teores limites dos contaminantes que não venham prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio.

A Áustria foi o primeiro país a definir e aprovar os padrões de qualidade para biodiesel, aplicados a ésteres metílicos (Lôbo et al., 2009). Consequentemente, padrões de qualidade foram sendo estabelecidos em outros países. Atualmente o padrão de qualidade americano, elaborado pela ASTM (*American Society of Testing and Materials*), através da norma ASTM D6751, e o estabelecido na União Européia através da norma EN 14214 do Comitê Europeu de Normalização (*Comité Européen de Normalisation* - CEN) figuram como os mais conhecidos e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões (Lewandoski et al.).

Arceo et al. (2012) comparou as propriedades do biodiesel obtido a partir de *Nannochloropsis oculata* com a norma padrão de qualidade para biodiesel e diesel segundo o método ASTM. E o biodiesel de microalga atendeu aos parâmetros de qualidade como ponto de fulgor, ponto de solidificação, ponto de filtração a frio e acidez, não atendendo apenas na viscosidade, que ficou um pouco mais alta que a faixa ASTM, conforme a Tabela 3.

Tabela 3- comparação das propriedades do biodiesel de microalgas e diesel convencional com o padrão do método ASMT para biodiesel

Propriedade	Biodiesel de microalga	Diesel	Padrão ASMT
Densidade (kg.L ⁻¹)	0,864	0,838	0,86-0,90
Viscosidade (mm ² .s ⁻¹ a 40°C)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Ponto de fulgor (°C)	115	75	Min 100
Ponto de saponificação (°C)	-12	-50 a -10	-
Ponto de filtração a frio (°C)	-11	-3,0 (máx -6,7)	Verão máx 0 inverno máx < -15
Acidez (mg KOH.g ⁻¹)	0,374	Max 0,5	Máx 0,5
Aquecimento (MJ.kg ⁻¹)	41	40-45	-
Taxa H/C	1,81	1,81	-

Fonte: Arceo et al. (2012)

A viscosidade e as propriedades de fluxo a frio do biodiesel dependem de sua composição química, da qual importam fundamentalmente os teores de ésteres saturados e insaturados e a variação do tamanho da cadeia hidrocarbônica destes ésteres. Estas características, por sua vez,

estão diretamente relacionadas à composição química da matéria-prima que lhe deu origem, ou seja, óleos ou gorduras animais ou vegetais. A Figura 4 ilustra a ocorrência de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados em várias matrizes vegetais e animais. Ésteres graxos saturados tendem a sofrer solidificação com a redução da temperatura ambiente, enquanto que ésteres graxos insaturados tendem a ser oxidados pela exposição às condições de manuseio do óleo (Ramos et al., 2017). Sendo assim, não existe matéria-prima ideal e o ajuste das propriedades tem sido realizado pela mistura de matérias-primas e, principalmente, pelo uso de aditivos.

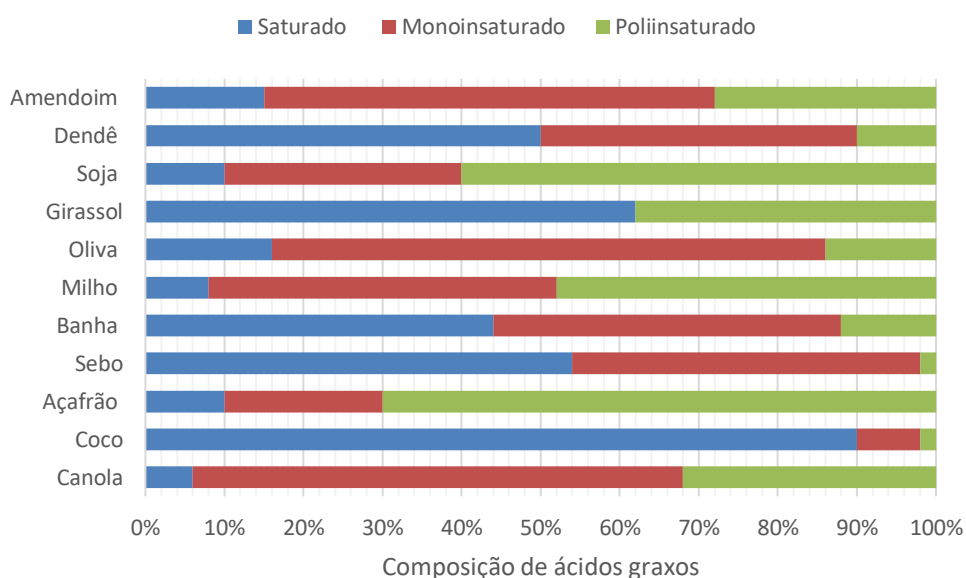


Figura 4 - Composição em ésteres graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados de alguns óleos e gorduras.

Fonte: Ramos et al. (2017)

A qualidade dos óleos, para produção de um biodiesel eficaz, é determinada pela quantidade e qualidade dos ácidos graxos insaturados que os compõem, por isso é importante conhecer sua composição (Deboni, 2017). A análise da composição de ácidos graxos é o primeiro procedimento para uma avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou dos seus produtos transformados. Existe uma grande variedade de técnicas analíticas para a detecção, caracterização e quantificação dos ácidos graxos no biodiesel. As técnicas cromatográficas mais utilizadas são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência associadas a sistemas de detecção (Romano, 2018). A GC é uma técnica de separação, de elevada viabilidade, muito utilizada na separação de ácidos graxos em óleos, gorduras e ésteres. Geralmente, o procedimento experimental de análise de óleos ou gorduras inclui uma etapa de preparação da amostra, em que

os ácidos graxos são isolados (Martins et al., 2017). A GC permite separar diretamente os ácidos graxos de cadeia curta. No caso dos ácidos graxos de cadeia longa, por apresentarem baixas volatilidade e estabilidade térmica, é necessária uma etapa adicional de derivatização, em que os grupos carboxílicos são convertidos em grupos mais voláteis como trimetil-ésteres ou metil ésteres (Oliveira et al., 2003).

A técnica de cromatografia gasosa geralmente é escolhida por ser um método analítico capaz de identificar a estruturas dos ésteres de biodiesel produzidos no processo de esterificação ou transesterificação, a cromatografia é um método físico-químico que tem a capacidade de separar componentes de uma amostra, realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases. Uma das fases está fixa, enquanto a outra passa através dela (Mayer, 2018). A amostra é introduzida no equipamento e conduzida pela fase móvel (líquida ou gasosa). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que, cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária por ter mais afinidade com esta, resultando em uma migração diferencial que promove a separação (Martins, 2016).

As microalgas são uma das matérias-primas renováveis mais promissoras. No entanto, a produção econômica de lipídios de microalgas em grandes escalas é condicionada pelo aumento do conteúdo lipídico de cepas potenciais sem perder sua taxa de crescimento ou pelo aumento de ambos simultaneamente. Uma das dificuldades associado ao cultivo de microalgas é o custo dos nutrientes usados nos processos de crescimento. Grandes esforços e avanços nessa área podem ser feitos para aprimorar a colheita e a produção de lipídios.

As microalgas foram consideradas como uma das matérias-primas de biocombustíveis mais promissoras que podem enfrentar os desafios da segurança energética e da proteção ambiental (Wang et al., 2018). Muitas espécies de algas sob certas condições têm a capacidade de acumular lipídios em suas células, esses lipídios podem ser usados para a produção de biodiesel. Para usar o óleo dessas células para a produção de biodiesel, é necessário extraí-lo da biomassa de algas. Os principais processos envolvidos na produção de biodiesel com microalgas são cultivo, colheita, secagem, extração de lipídios (ruptura celular) e conversão de biocombustíveis (Skorupskaite et al., 2017).

2.1.3. Microalga *Scenedesmus* sp.

As *Scenedesmus* são as microalgas mais encontradas no plâncton de águas doces e menos frequentemente em águas salobras. São seres clorofilados, unicelulares e uninucleadas, pertencentes à família *Scenedesmaceae*, gênero *Scenedesmus* sp, têm formas elipsoidais, fusiformes ou ovóides, colônias planas e suas células se agrupam em número de 4, 8, ou em casos mais raros 16 ou 32 células, Figura 5.



Figura 5- Microalga *Scenedesmus* sp. vista no microscópio óptico.

Segundo Chew et al. (2018), a *Scenedesmus* sp. possui um rápido crescimento e uma alta capacidade de adaptação quando às condições de cultivo. É uma microalga de fácil obtenção, além de ser largamente utilizada como alimento para os microcrustáceos utilizados em ensaios de ecotoxicologia (Vidal, 2016). Elas utilizam diversas fontes de nitrogênio e podem crescer num intervalo de temperatura entre 15 e 40°C. Essa facilidade de cultivo e manuseio impulsiona a aplicação industrial desse tipo de microalga tanto no setor de alimentos quanto no setor de combustíveis.

A *Scenedesmus* sp. tem sido utilizada para produção de biomassa, tratamento de águas em lagoas de oxidação e já foi estudada a possibilidade de sua utilização no tratamento de efluente de

lagares (fabricas de azeite) e de aguas residuais urbanas (Mutanda et al., 2011). A Tabela 4 mostra uma comparação da composição química de diferentes microalgas.

Tabela 4 - Composição química de diferentes microalgas

Produto	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
<i>Scenedesmus obliquos</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1-9
<i>Scenedesmus sp.</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7

Fonte: Becker (1994)

O teor de lipídeos da microalga *Scenedesmus sp.* varia de 11 a 20%, quando cultivada em condições padrões, e pode chegar a 70% quando o meio de cultivo é otimizado em relação as concentrações ótimas de nutrientes do meio sintético (Fernandes et al., 2017). De acordo com Andrade et al. (2014) a *Scenedesmus sp* possui um teor de lipídios entre 19,6% e 21,1% em peso de biomassa seca. Pereira et al. (2012) afirma que as taxas de ácidos graxos podem chegar até 65% e segundo Ramirez (2013), a espécie *Scenedesmus sp.* possui até 56% de proteínas e 52% de carboidratos.

2.2. NUTRIÇÃO DAS ALGAS

A composição química das microalgas varia a depender da sua espécie e das condições de cultivo para cada espécie; além de outros fatores. Sendo, o estudo dessas influências fundamental para a aplicação biotecnológica desses microrganismos. Basicamente quatro componentes estão presentes majoritariamente na biomassa microalgal, sendo estes as proteínas, os lipídios, os pigmentos e os carboidratos (Andrade et al., 2014).

Cada espécie de microalga possui a sua particularidade e preferência de nutrientes. Pode-se afirmar que boa parte das microalgas podem utilizar como fonte de nutrientes as águas residuais ricas em matéria orgânica a ser degradada (Cardoso et al., 2011). A *Scenedesmus sp.* tem sido utilizada para produção de biomassa, tratamento de águas em lagoas de oxidação e de águas residuais urbanas.

Em linhas gerais, a interação entre diversos aspectos químicos, físicos e biológicos é o que determina o crescimento de microalga. Em condições de cultivo adequadas, as microalgas podem duplicar o seu número de células em apenas 24h (de Almeida Lopes et al., 2015). Na Tabela 5, estão listadas algumas condições de cultivo que afetam o perfil graxo das microalgas.

Tabela 5 - Efeito das diferentes culturas no perfil graxo das microalgas

Tipo de cultura	Efeito no perfil graxo
Baixa concentração de N	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de N	Diminui a quantidade de C22
Aumento na intensidade luminosa	Aumenta a quantidade de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de 20:5 e 22:6
Mn+2	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de CO ₂	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Baixa concentração de P	Aumenta o conteúdo lipídico

Fonte: BEHRENS and KYLE (1996)

Segundo de Medeiros Jeronimo et al. (2015), para que as microalgas possam se desenvolver, é necessário que fatores classificados como físicos e nutritivos importantes ao seu desempenho celular e atividades metabólicas sejam atendidos. A Tabela 6 ilustra quais são esses fatores, a classificação à qual pertencem e informações adicionais.

Tabela 6- Principais fatores físicos e nutritivos necessários ao cultivo das microalgas

	Requerimentos	Compostos Químicos
Físicos	Intensidade Luminosa	
	Tempo de iluminação	
	Temperatura	
	pH	
	Agitação	
Nutritivos	C	CO ₂ CO ₃ ≅
	O,H	O ₂ H ₂ O ≅
	N	N ₂ NH ₄ ⁺ NO ₃ ≅
	P	PO ₄ ≅
	S	SO ₄ ≅
	Na, K, Ca, Mg	Sais
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sais
	Cu, Co, Cl, I,Sr, Rb, Al	Sais
	Vitaminas	B12, tiamina, biotina

Fonte: SILVA, BACHOLSKY, JERÔNIMO (2015); ANDRADE (2014).

Andrade *et al* (2014) afirma que há uma composição média adequada desses fatores nutritivos. A quantidade requerida para o cultivo caracteriza-os como macronutrientes, a exemplo do carbono, nitrogênio e oxigênio, ou micronutrientes, como o zinco, boro e cobre.

Carbono é o macronutriente que deve apresentar maiores concentrações, por ser o principal constituinte da matéria orgânica sintetizada pelas células, como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídeos. Segundo Andrade (2014) sua contribuição para a biomassa é estimada em 50%, distribuído entre as proteínas, vitaminas, carboidratos e lipídios.

As microalgas, através da fotossíntese, podem sintetizar ácidos graxos a partir de fontes de carbono, como o CO_2 , e também diretamente a partir de fontes de carbono orgânicos (glicose, acetato, etc.), são os modos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, sendo que a diferença entre eles justamente a fonte de energia e de carbono (Leong et al., 2018). No cultivo autotrófico, mais especificamente, fotoautotrófico, as células obtêm energia da luz e o carbono do CO_2 do ar, produzindo então, através da fotossíntese, suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. No cultivo heterotrófico, as células utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono e, no mixotrófico, usam a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO_2 e compostos orgânicos como fonte de carbono. A composição e a quantidade de lipídios dependem da espécie de microalgas e das condições autotrófica ou heterotrófica de crescimento. Esses e os demais macronutrientes são encontrados na natureza através das seguintes fontes dispostas na Tabela 7.

Tabela 7 - Macronutrientes e suas respectivas fontes na natureza

Elemento	Forma usual encontrada na natureza	Forma química fornecida em meio de cultura
Carbono (C)	CO_2 , compostos orgânicos	Glicose, malato, acetato, entre outros
Hidrogênio (H)	H_2O , compostos orgânicos	H_2O , compostos orgânicos
Oxigênio (O)	H_2O , O_2 , compostos orgânicos	H_2O , O_2 , compostos orgânicos
Nitrogênio (N)	NH_3 , NO_3^- , N_2 , compostos orgânicos nitrogenados	NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , N_2 , aminoácidos, entre outros
Fosforo (P)	PO_4^{3-}	KH_2PO_4 , NaHPO_4
Enxofre (S)	H_2S , SO_4^{2-}	Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2S , entre outros
Potássio (K)	K^+ em solução ou sais de K	KCl , KH_2PO_4
Magnésio (Mg)	Mg^{2+} em solução ou sais de Mg	MgCl_2 , MgSO_4
Sódio (Na)	Na^+ em solução ou sais de Na	NaCl
Cálcio (Ca)	Ca^{2+} em solução ou sais de Ca	CaCl_2
Ferro (Fe)	Fe^{2+} , Fe^{3+} ou sais de Fe	FeCl_3 , FeSO_4 , $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$

Fonte: Andrade (2014)

As composições de microalgas como proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos etc. mudam muito com a alteração das condições de cultivo (Liao et al., 2017, Zhai et al., 2017). Os principais macronutrientes na nutrição das microalgas são o nitrogênio, fósforo e ferro. Ambientes pobres em nitrogênio desfavorecem o uso de carbono presente na produção de proteínas e destinam-no para a produção de carboidratos e lipídios, ou, em algumas espécies, favorece a produção de pigmentos (Anyanwu et al., 2018).

Para Hakalin (2014) a limitação de nutrientes, particularmente nitrogênio, muitas vezes é uma forma eficaz de aumentar os componentes alvo células microalgais. Nitrogênio possui um papel importante também por ser responsável pela formação de proteínas, ácidos nucleicos e vitaminas. Sob condições de estresse de nitrogênio, a maioria das microalgas têm potencial para acumular uma grande proporção de lipídios ou carboidratos (Ikaran et al., 2015). As espécies de algas mais amplamente estudadas para remoção de nitrogênio e fósforo são *Scenedesmus* (Shi et al., 2007), *Chlorella* (Hernandez et al., 2006) e *Spirulina* (Olguín, 2003).

Segundo Li et al. (2016) para aumentar a produtividade da biomassa e acumular compostos mais desejáveis em microalgas, é de grande importância desenvolver novas estratégias para o cultivo microalgal com limitação de nitrogênio

O fósforo, responsável pela transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos e apresenta direta participação na produção de biomassa (Jacob-Lopes et al., 2018), de forma menos marcante que o nitrogênio, sua deficiência também estimula a formação de alguns pigmentos. Considerando que as próprias células das microalgas produzem água oxigenada, quando há excesso de ferro no meio de cultura ocorre uma reação entre esses dois componentes, causando um estresse oxidativo nas células (Andrade, 2014).

Diversos fatores podem gerar interferência no crescimento das microalgas, na absorção de nutrientes e na acumulação de lipídios. Um desses fatores é a concentração de nutrientes disponível no ambiente de cultivo (Shin et al., 2018). Otimizar o fornecimento de nutrientes é um pré-requisito fundamental para altas taxas de crescimento. Deficiência em qualquer nutriente pode causar perturbação metabólicas, alterações fisiológicas e queda de produtividade (Kim, 2015).

2.3. FATORES FÍSICOS

Usualmente as microalgas possuem três tipos de metabolismo em especial que basicamente se diferenciam quanto a fonte de carbono e de energia: autotrófico, através de compostos inorgânicos que se tornam nutrientes e uso da energia da luz; heterotróficos, por meio do consumo de fontes orgânicas como fonte de carbono e energia; ou mixotrófico, que pode utilizar tanto a matéria inorgânica como orgânica para se manter nutrida e como fonte de energia utilizam a luz ou compostos orgânicos (Jarenkow, 2014), (Franco et al., 2013).

De acordo com Franco et al. (2013), apesar da alta eficiência do cultivo autotrófico, o crescimento da microalga é lento em larga escala devido à limitação da luz ou à fotoinibição causada por luz excessiva. No caso do cultivo heterotrófico, há a possibilidade de aumento da produtividade de biomassa devido à eliminação da necessidade da luz, podendo aumentar a concentração celular e a produção de lipídios. O cultivo mixotrófico também é limitado pela disposição da luz, tornando necessário o estudo de novas alternativas.

Onumaegbu et al. (2018) mencionam que eles desenvolveram uma forma de cultivo autotrófico-heterotrófico, onde o CO_2 produzido na fase autotrófica é usado na fase heterotrófica. Desta forma, o aumento da conversão do carbono de açúcar em lipídios foi evidenciado através do cultivo fotossíntese-fermentação, aumentando a produção de lipídios em 69% comparado ao processo puramente heterotrófico e reduzindo em 66,7% a liberação de CO_2 com relação ao cultivo unicamente autotrófico.

2.3.1. Intensidade Luminosa e Tempo de Iluminação

De acordo com Ramirez (2013), o aproveitamento da energia radiante torna-se fator determinante no cultivo de microrganismos fotoautótrofos; visto que, a taxa de fotossíntese realizada pelas células é função da energia luminosa recebida pelas células.

Cada organismo possui uma constante específica (E_k) correspondente ao nível de energia luminosa incidente em que há a saturação da taxa de fotossíntese. O efeito da energia luminosa (E) na taxa fotossintética (F) é esquematizada pela Figura 6.

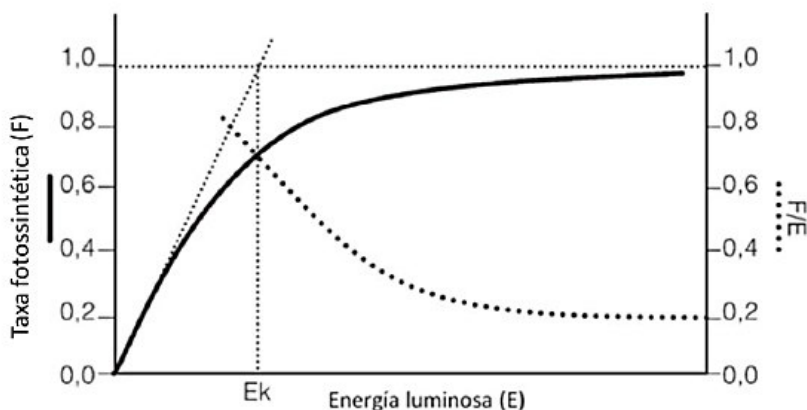


Figura 6 - Influência da energia luminosa (E) na taxa fotossintética (F) e a eficiência da fotossíntese (F/E).
Fonte: Ramirez (2013).

A eficiência da fotossíntese (F/E) corresponde à quantidade de energia luminosa que foi convertida em energia química. Conforme representado pela a figura 1, há uma brusca diminuição da eficiência em valores de energia incidente maiores que E_k . Além disso, Andrade (2014) afirma que uma intensidade excessiva de fluxo luminoso pode favorecer a produção de espécies de oxigênio reativas a exemplo do H_2O_2 , danificando a estrutura celular e podendo causar a fotoinibição.

Intensidades luminosas baixas estimulam a formação de uma biomassa rica em clorofila, enquanto altas intensidades favorecem os parâmetros de crescimento. A faixa espectral da radiação absorvida pelas algas fotossintetizantes é de 400 nm a 700 nm e estes organismos não diferenciam a luminosidade natural da artificial, o que facilita o seu cultivo em laboratório. Desta forma, a fonte de luz é definida em termos de fotoperíodos (tempo de iluminação) e em cultivos de laboratório usualmente aplica-se 12 horas de luz, promovidas por lâmpadas fluorescentes e de luz branca (Andrade and Costa, 2008, Andrade, 2014).

Ramirez (2013) afirma que, em cultivos de larga escala, o comportamento da fotossíntese se desvia dessa representação gráfica, visto que a alta densidade celular no meio aumenta a capacidade celular de utilização da energia luminosa.

2.3.2. Temperatura

Conforme exposto por Andrade (2014), a temperatura de cultura das microalgas afeta a taxa metabólica, a composição e o crescimento celular, variando de acordo com cada espécie e o seu valor ótimo para o cultivo depende do local onde a espécie foi coletada. Exemplificando, microalgas provenientes de ambientes temperados possuem temperatura ótima de cultivo na faixa de 10°C a 25°C, já as oriundas de ambientes polares a temperatura ideal de cultivo é abaixo de 10°C. Andrade et al. (2014) afirmam, também, que a temperatura influi na solubilização de alguns nutrientes no meio de cultura, a exemplo do dióxido de carbono.

A temperatura é um fator decisivo no crescimento microbiano pois interfere na velocidade das reações enzimáticas. Via de regra, as taxas de reação aumentam com o aumento de temperatura, portanto, os metabolismos microbianos são mais ativos em maiores temperaturas. É importante salientar que a partir da temperatura ótima há uma queda no crescimento, podendo causar a desnaturação das enzimas e dos constituintes das células microbianas (Ramirez, 2013).

2.3.3. pH

De acordo com Andrade et al. (2014), o pH trata-se de um dos parâmetros essenciais no cultivo de microalgas, pois determina diretamente a solubilidade de alguns nutrientes como os minerais e o dióxido de carbono (fonte de carbono), além de ter influência sobre o metabolismo das algas.

A maior parte das algas possuem melhor metabolismo em pH neutro a alcalino. As elevações de pH ocorrem naturalmente à medida que o íon bicarbonato se desidrata formando íons OH^- e CO_2 , porém, ao ocorrer a liberação do CO_2 no meio há uma redução no pH, sendo fundamental o tamponamento adequado do meio de cultura (Andrade, 2014).

Microrganismos acidófilos tem o seu pH ótimo entre 0 e 5,5, os neutrófilos entre 5,5 e 8, já os alcalófilos na faixa de 8,5 a 11,5. Apesar desses organismos serem capazes de crescer em uma grande faixa de pH, existem valores de tolerância para cada um deles. Variações bruscas no pH podem ocasionar o rompimento da membrana celular, inibindo a atividade das enzimas e dos transportadores de proteínas na membrana (Ramirez, 2013).

2.3.4. Agitação

A agitação é um fator importante pois, segundo Andrade (2014), ela evita a sedimentação das microalgas, proporcionando desta forma uma exposição das células à luz de forma mais homogênea. Além disso, a agitação mantém os nutrientes em suspensão, aumentando a sua disponibilidade no meio.

De acordo com Franco et al. (2013), o cultivo das microalgas visando evitar a baixa produtividade geral de óleos deve ser realizado em duas etapas. A primeira etapa consiste em oferecer à microalga as condições físicas e nutritivas ótimas para o seu máximo crescimento. No caso da segunda etapa, as condições de estresse são aplicadas, como por exemplo, a restrição de nutrientes importante, os quais já foram mencionados anteriormente.

Baseado em estudos de Veljković et al. (2018), afirma-se que os principais sistemas de cultivo de microalgas consistem em fotobiorreatores fechados, lagoas ou tanques abertos aerados.

Tratando-se do sistema fechado, pode-se utilizar reatores tubulares vertical, horizontal ou helicoidal, elaborados com materiais transparentes como acrílico ou plástico. Têm-se também o reator em placas, caracterizado por possuir uma área aberta de exposição aos gases, facilitando a transferência gasosa. O reator do tipo fermentador torna necessário o uso de recursos como iluminação artificial interna e agitação mecânica controlada, sendo a sua grande vantagem a maior produtividade de biomassa, proteção contra grandes contaminações, especialmente por espécies de fungos, além de evitar a inibição por descontrole na intensidade de luz oferecida em sistemas abertos (Cardoso et al., 2011).

Segundo Franco et al. (2013) boa parte do cultivo de microalgas em larga escala tem sido realizado em cultivo aberto, em lagoas ou tanques que utilizam a luz solar e o CO₂ atmosférico. Essa modalidade possui vantagens como o baixo custo e facilidade relacionada à construção e manutenção do cultivo, visto que não há muitas restrições quanto aos materiais a serem utilizados para confeccionar os tanques, bem como o acesso livre para a remoção de biofilmes na superfície.

As desvantagens do cultivo aberto consistem principalmente na taxa de evaporação da água de forma semelhante aos cultivos terrestres e a maior suscetibilidade a contaminação do meio por espécies de microrganismos indesejáveis, devido à exposição do meio ao ambiente. Desta

forma, o cultivo aberto é indicado para espécies de microalgas que convivam em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (Franco et al., 2013).

2.4. CULTIVO

2.4.1. Sistemas de cultivo

Desde a década de 1950 vêm-se estudando a combinação de água do mar e luz solar para produção de culturas de microalgas ricas em biomassa com proteínas de alta qualidade (Bonini, 2016). Durante os anos 60 e 70, vários grupos de pesquisa, tanto de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, dedicaram esforços para tentar alcançar rendimentos de biomassa que pudessem ser comparados àqueles obtidos com microorganismos não autotróficos (principalmente levedura) (Scoparo, 2010). Ao longo dos anos o estudo de microalgas eucarióticas e cianobactérias vem crescendo e com aplicações promissoras, especialmente na produção de biocombustíveis, em tratamento de águas residuais, para obter produtos terapêutico ou aplicado a compostos terapêuticos e alimentos para consumo humano ou animal. No entanto, a produtividade teórica estimada de 100 toneladas por ano por hectare de culturas de microalgas não poderia ser alcançado mesmo em laboratórios de pesquisa, até o início dos anos 90 (de Azeredo, 2012). O cultivo intensivo de microalgas tem sido possível em grande parte graças ao desenvolvimento de novos projetos de fotobiorreatores. Existem dois modelos básicos para a produção de microorganismos fotoautotróficos (Sassi, 2016), sistemas abertos (Figura 7a), onde a cultura está exposta à atmosfera e sistemas fechados (Figura 7b), chamados fotobiorreactores, em que a cultura tem pouco ou nenhum contato com o atmosfera.



Figura 7- a) Fotobiorreatores de Sistema aberto – LCA/UFSC; b) Fotobiorreatores de Sistema Fechado

A Figura 8 ilustra os avanços que ocorreram campo dos biorreatores, principalmente durante a última década.

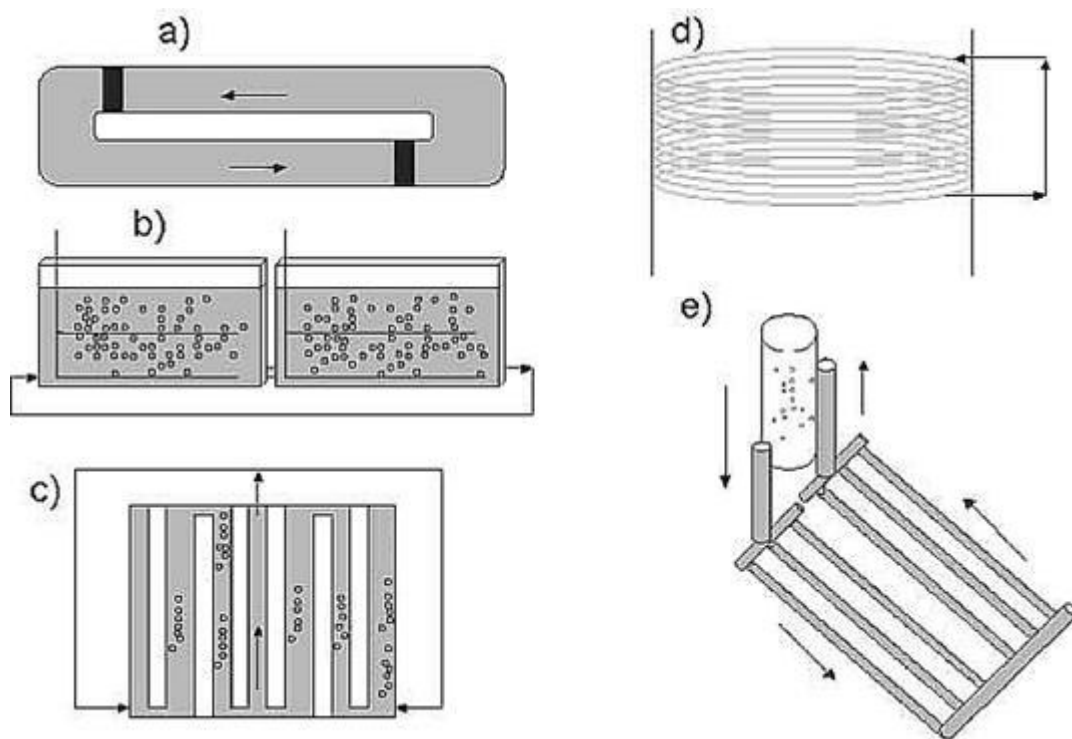


Figura 8 - Tipos básicos de fotobiorreatores: a) tipo carrossel, vista superior, as partes escuras indicam palhetas; b) tipo plano, vista horizontal; c) com iluminação interna, os espaços em branco indicam iluminação interna; d) tipo serpentina; e) tipo tubular horizontal com sistema *airlift*.
Fonte: Flores et al. (2003)

A maioria dos sistemas de produção de biomassa de microalgas industriais construídos antes dos anos 90 eram essencialmente sistemas abertos do tipo carrossel (Figura 8a), que permitem

atingir densidades celulares de até 0,7 g de células (base seca) por litro (Neves, 2013). Estes sistemas, constituídos por canais pouco profundos (nível de água de 15-20 cm) na forma de circuito fechado, em que o meio de cultura é acionado por palhetas rotativas, geralmente requerem grandes áreas de terra (500-5000 m²), têm como vantagem o baixo custo de produção de biomassa de algas em algumas zonas geográficas específicas. No entanto, o desenvolvimento desta tecnologia há muito tempo atingiu o seu limite, restringindo assim o desenvolvimento da biotecnologia de microalgas. A baixa densidade celular provoca vários inconvenientes, incluindo baixa produtividade, fácil contaminação, recuperação dispendiosa do produto a partir de meios diluídos e dificuldade em controlar a temperatura. Essas desvantagens estimularam o desenvolvimento de fotobiorreatores construídos com materiais transparentes, como vidro e policarbonato, entre outros materiais.

Os primeiros fotobiorreatores foram propostos pela Pirt et al. (1983), Chaumont (1993) e Torzillo et al. (1986). Na última década fotobiorreatores tubulares e a placa plana (Figura 8b-e) se tornaram mais vantajosos pois permitem a culturas ter sua densidade celular elevada cerca de 3 vezes ou mais em comparação com sistemas convencionais de carrossel. Dentre as vantagens associadas a esse sistema estão: facilidade de colheita da biomassa; manutenção da cultura sem contaminação; melhor controle das condições de cultivo e menor investimento de capital no fotobiorreator (Flores et al., 2003). Este último fator é um elemento importante no custo de produção dos diversos derivados de microalgas.

Nos fotobiorreatores as culturas podem ser monitoradas, possibilitando o controle das condições de cultivo como densidade celular ou biomassa, concentração de nutrientes, temperatura e pH (CASSURIAGA et al., 2015). Outras vantagens incluem o controle do fluxo de ar e água, dissolução dos gases, a redução da vulnerabilidade a contaminações (para os fotobiorreatores fechados) e a utilização eficiente dos nutrientes do meio de cultura.

Por conta dos elevados custos de implantação e de operação, os fotobiorreatores têm sido desenvolvidos visando à produção de biomassa rica em produtos de elevado valor comercial, empregada como matéria-prima para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, por exemplo (Moraes, 2018). Assim, a escolha do sistema de cultivo a ser implantado deve ser feita levando em consideração o produto a ser obtido e a sua aplicação.

2.4.2.Taxa de crescimento

A taxa de crescimento é definida como variação do número de células por unidade de tempo. Devido à variação da taxa de crescimento microbiano ao longo do tempo a curva de crescimento pode ser dividida em diferentes fases: fase lag (1); fase log ou exponencial (2); fase estacionária (3) e fase de declínio ou morte celular (4). Conforme ilustrado na Figura 9.

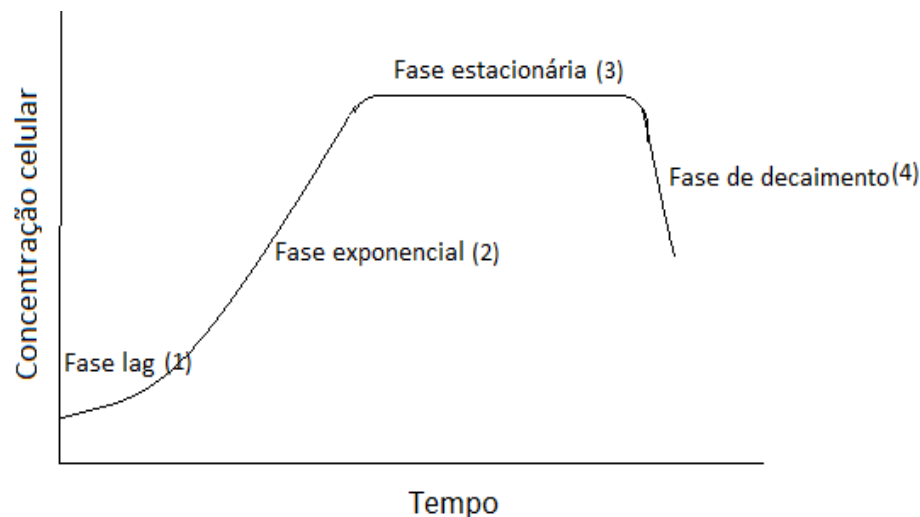


Figura 9 – Curva de crescimento de microalga

A fase *lag* corresponde ao período de tempo em que o número de células sofre pequenas variações, devido ao fato que os microorganismos não se reproduzem imediatamente após a inoculação. A fase *log* ou crescimento exponencial corresponde ao período em as células iniciam seu processo de divisão atingindo um tempo de geração constante. É o período de maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio preferido para fins industriais. Na fase estacionária, o número de indivíduos que morrem é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável. A fase de morte celular ou fase de declínio corresponde ao período em que o número de mortes excede o número de células novas, até existir uma fração ínfima do original e a população desaparece totalmente. Algumas espécies completam este ciclo de 4 fases em poucos dias, outras, no entanto, podem permanecer com poucas células viáveis indefinidamente (Maciel et al., 2017).

Da Silva et al. (2014) cita critérios a serem levados em consideração na escolha do processo de cultivo, dentre eles destacam-se a taxa de crescimento, normalmente mensurado através do total de biomassa produzido em uma unidade de volume por unidade de tempo;

disponibilidade de nutrientes, em particular dióxido de carbono para realizar o sequestro de carbono; tenacidade e resistência as variações das condições do ambiente, tais como luz, temperatura e contaminação de outros microorganismos; facilidade na colheita de biomassa e tempo de descarga.

2.4.3. Meio sintético para o cultivo de microalgas

Alguns dos meios comumente utilizados para cultivo de cianobactérias são BG-11 e o ASM-1. Na Tabela 8 encontra-se a composição química dos dois meios e as concentrações dos nutrientes.

Tabela 8 - Composição e quantidade das soluções estoques

Nutrientes	BG-11 (g.L ⁻¹)	ASM-1 (g.L ⁻¹)
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,10	-
C ₆ H ₈ O ₇ x Fe ³⁺ + yNH ₃	0,60	-
NaNO ₃	150	8,50
K ₂ HPO ₄ + 3H ₂ O	4,00	8,70
MgSO ₄ + 7H ₂ O	7,50	2,45
CaCl ₂ + 2H ₂ O	3,60	1,45
Na ₂ CO ₃	2,00	-
C ₆ H ₈ O ₇ + H ₂ O	0,60	-
H ₃ BO ₃	2,86	24,80
MnCl ₂ + 4H ₂ O	1,81	13,90
ZnSO ₄ + 7H ₂ O	0,222	-
NaMoO ₄	0,39	-
CuSO ₄ + 5H ₂ O	0,079	-
Co(NO ₃) ₂ + 6H ₂ O	0,0494	-
MgCl ₂ + 6H ₂ O	-	2,05
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	-	17,80
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	6,50
ZnCl ₂	-	3,35
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0,19
CuCl	-	0,014

Fonte: JACINAVICIUS et al. (2013)

As microalgas necessitam de uma quantidade de sais específicas para o seu crescimento e atividade celular, a fim de reduzir significativamente o custo do meio de cultura têm-se utilizado efluente para substituir ou complementar o meio, dessa forma, diminuindo também a poluição secundária do efluente no meio ambiente (Luo et al., 2016).

O uso de águas residuárias como fonte de nutrientes para cultivar microalgas é considerado como tendo potencial econômico e ambiental para a produção de biomassa, assimilação de nutrientes das águas residuais e diminuindo a contaminação da água (Zhai et al., 2017).

2.4.4. Manipueira

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é uma raiz cultivada a mais de 5.000 anos na América Tropical, que teve a sua origem no Brasil, região amazônica fronteira com a Venezuela (Fernandes, 2017). A mandioca é uma planta de fácil adaptação que pode ser consumida *in natura* ou destinada à indústria de fabricação de farinha ou fécula. De acordo com dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2016) a produção mundial de raiz de mandioca correspondeu a 277,1 milhões de toneladas. O maior produtor mundial é a Nigéria, que no ano de 2016 computou 57,13 milhões de toneladas, seguido por Tailândia e Indonésia. O Brasil é o 4º maior produtor mundial com 21,08 milhões de toneladas de raiz de mandioca. A Figura 10 ilustra a série contendo os maiores produtores mundiais no período de 2005 a 2016.

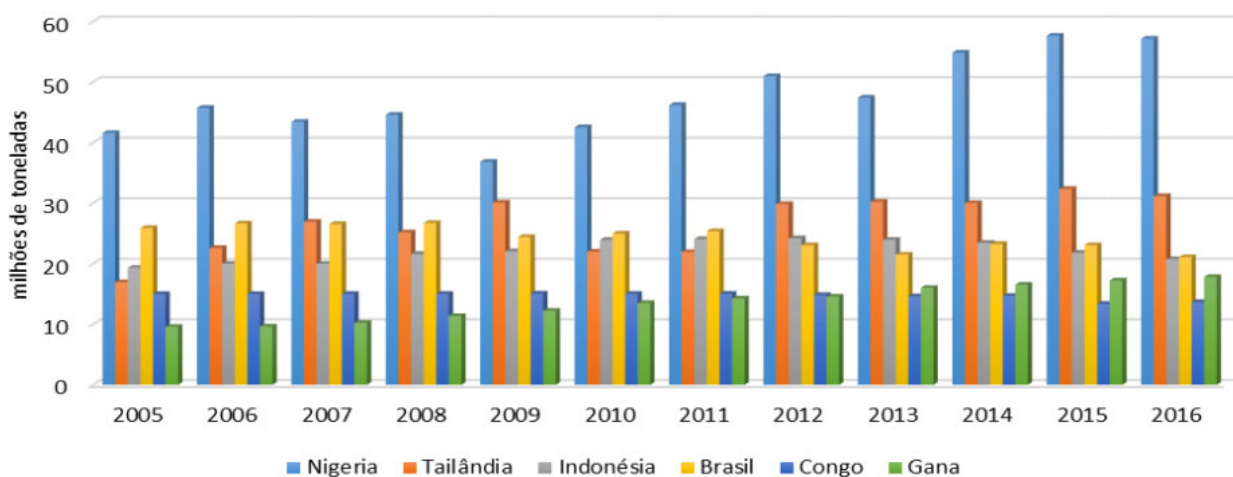


Figura 10 - Evolução da produção de mandioca nos principais países.

Fonte: FAO (2016)

De acordo com o Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA, 2017) a produção as regiões Norte e Nordeste possuem juntas aproximadamente 61,18% da produção

nacional de mandioca (t) em 72% das áreas cultivadas (ha) e detêm as maiores produções nacionais como mostra a Figura 11.



Figura 11 – Distribuição percentual de mandioca (t/ha) no território nacional safra 2017

Fonte: EMBRAPA (2017)

De acordo com o Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA, 2017) o estado de Sergipe é o decimo oitavo maior produtor de mandioca (t) do Brasil, tendo cerca de 1,2 ha do seu território plantado. Na safra de 2017 o estado de Sergipe obteve produção de 238.916 toneladas de mandioca como mostra a Figura 12 da tabela retirada do site do EMBRAPA.

Área Plantada (ha)				Produção (ton/ha)			
Pará		295.137		Pará		4.234.597	
Brasil		1.407.345		Brasil		20.606.037	
Pará / Região Norte			60,66%	Pará / Região Norte			56,96%
Pará / Brasil			20,97%	Pará / Brasil			20,55%
Regiões	ha	%	Ranking	Regiões	toneladas	%	Ranking
Nordeste	526.239	37,4%	1°	Nordeste	5.172.156	25,1%	1°
Norte	486.550	34,6%	2°	Norte	7.434.781	36,1%	2°
Sul	208.135	14,8%	3°	Sul	4.556.462	22,1%	3°
Sudeste	122.424	8,7%	4°	Sudeste	2.254.348	10,9%	4°
Centro-Oeste	63.997	4,5%	5°	Centro-Oeste	1.188.290	5,8%	5°
Estados	ha	%	Ranking	Estados	toneladas	%	Ranking
Pará	295.137	21,0%	1°	Pará	4.234.597	20,6%	1°
Bahia	192.137	13,7%	2°	Paraná	3.046.721	14,8%	2°
Maranhão	151.157	10,7%	3°	Bahia	2.078.752	10,1%	3°
Paraná	125.716	8,9%	4°	Maranhão	1.315.554	6,4%	4°
Amazonas	86.298	6,1%	5°	São Paulo	1.142.556	5,5%	5°
Rio Grande do Sul	60.001	4,3%	6°	Acre	1.099.913	5,3%	6°
Minas Gerais	56.851	4,0%	7°	Rio Grande do Sul	1.066.857	5,2%	7°
Ceará	56.211	4,0%	8°	Minas Gerais	840.897	4,1%	8°
São Paulo	46.618	3,3%	9°	Amazonas	832.095	4,0%	9°
Acre	39.358	2,8%	10°	Mato Grosso do Sul	695.783	3,4%	10°
Piauí	37.073	2,6%	11°	Rondônia	658.268	3,2%	11°
Mato Grosso do Sul	31.840	2,3%	12°	Ceará	474.984	2,3%	12°
Rondônia	29.163	2,1%	13°	Santa Catarina	442.884	2,1%	13°
Pernambuco	23.217	1,6%	14°	Alagoas	303.957	1,5%	14°
Santa Catarina	22.418	1,6%	15°	Mato Grosso	281.962	1,4%	15°
Alagoas	21.555	1,5%	16°	Piauí	276.013	1,3%	16°
Mato Grosso	19.093	1,4%	17°	Tocantins	264.348	1,3%	17°
Sergipe	16.389	1,2%	18°	Sergipe	238.916	1,2%	18°
Tocantins	15.615	1,1%	19°	Goiás	228.886	1,0%	19°
Paraíba	15.406	1,1%	20°	Pernambuco	197.611	1,0%	20°
Rio Grande do Norte	13.094	0,9%	21°	Roraima	179.010	0,9%	21°

Figura 12 – Monitoramento e diagnósticos do ano de 2017 da área plantada (ha) e produção em toneladas.
Fonte: EMBRAPA (2017)

Durante as etapas de processamento da mandioca, são gerados resíduos sólidos (compostos pelas partes lenhosas das raízes, pelas porções fibrosas retidas em peneiras e pelos bagaços da mandioca) como também efluentes (resultantes da água de lavagem das raízes e da água de prensagem da mandioca, esta última comumente denominada manipueira), estão presentes nesses resíduos e efluentes, nutrientes como açúcares (sacarose, glucose, frutose e maltose), nitrogênio, potássio, sais minerais, glicosídeos.

A composição química da manipueira depende de fatores relacionados ao cultivo, às condições climáticas do local onde está localizado o cultivo, ao solo, ao tipo de processamento utilizado para obtenção da farinha ou do amido e ao processo empregado para o seu tratamento, antes do descarte no meio ambiente. (Magalhães et al., 2014)

Para cada tonelada processada de raízes de mandioca são obtidos cerca 300 L de manipueira (Costa, 2018). Este efluente, geralmente é descarregado no ambiente, ocasionado problemas ambientais, por possuir íons cianeto e uma grande carga de matéria orgânica dispersos em solução, fazendo com que ocorra a redução de oxigênio na água com danos às formas aeróbias de vida, devido ao processo de eutrofização das águas. A manipueira tem poder poluidor de 25 vezes mais que o esgoto doméstico, reduzindo para metade quando diluída (MARQUES, 2009, Abrantes, 2013).

A manipueira é responsável por boa parte da poluição produzida nas áreas decorrente do despejo nos rios e açudes que polui as águas, causando intoxicação nas pessoas, além da morte dos peixes e de outros animais. Segundo Neves et al. (2014) é um dos resíduos mais prejudiciais ao ambiente, não só por possuir elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), como também pela alta concentração de ácido cianídrico, altos teores de potássio, magnésio, cálcio e fósforo.

De todos os resíduos advindos do processamento da mandioca o ácido cianídrico (HCN) é o mais poluente e tóxico cuja ingestão ou mesmo inalação, representa sério perigo à saúde, podendo ocorrer casos extremos de envenenamento (Chisté et al., 2010). Diante disso diversos trabalhos foram desenvolvidos a fim de quantificar e avaliar a cinética de remoção do ácido cianídrico (HCN) presente na manipueira.

Chisté et al. (2010) quantificaram a concentração de cianeto total durante as etapas de produção da farinha de mandioca de dois diferentes grupos de mandiocas, seca e d'água, e verificou que o processamento da farinha de mandioca em si já trata-se de um processo efetivo na destoxificação do cianeto na mandioca, uma vez que a concentração de HCN durante as etapas diminuiu drasticamente (aproximadamente 97%) em ambos os processos.

Neves et al. (2014) estudou o tempo de persistência do cianeto em manipueira submetida a repouso em condições naturais e após tratamentos físicos. Eles verificaram que os tempos eliminação do cianeto da manipueira independem de tratamentos físicos, sendo, em condições ambiente, entre 50 e 60 dias de repouso o cianeto livre não é mais detectado, como ilustrado na Figura 13. Verificou ainda que tratamentos físicos para a redução da carga orgânica da manipueira só são eficientes na redução dos teores de cianeto livre quando analisados nos primeiros dias após a coleta.

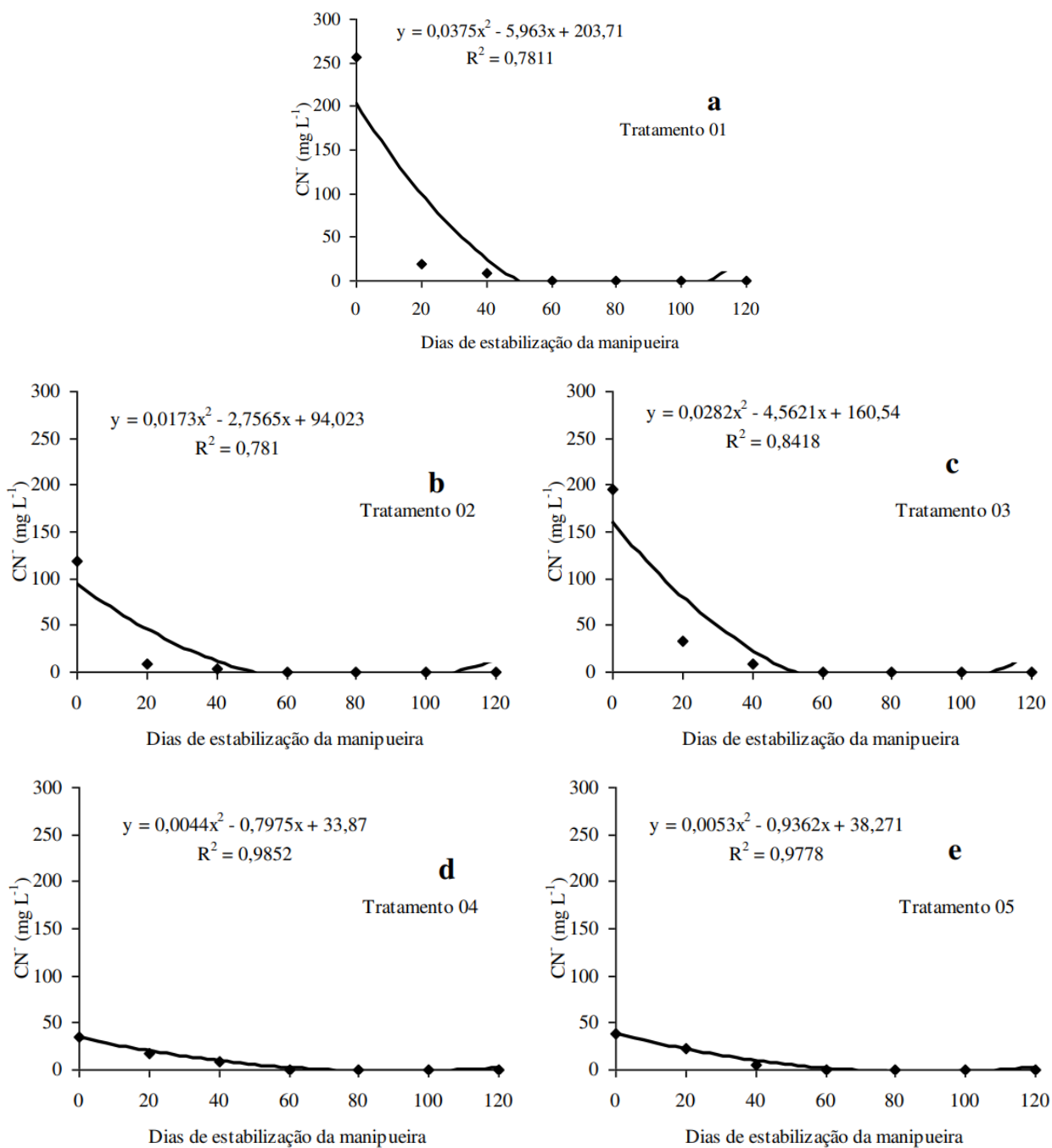


Figura 13 - Persistência do cianeto na maniveira em função do tempo. Maniveira sem tratamento físico (a); Maniveira Filtrada (b); Maniveira Decantada por 24h (c); Maniveira Decantada por 24h e Filtrada (d); Maniveira Decantada por 24h, Filtrada e Centrifugada a 4.000 RPM / 10 minutos (e).
Fonte: Neves et al. (2014)

Rebouças et al. (2015) avaliaram a cinética de remoção do ácido cianídrico (HCN) presente na maniveira, coletada de casas de farinhas do estado de Sergipe, a temperaturas

constantes como mostrado na Figura 14. Os estudos mostraram que a concentração de cianeto na manipueira ao final do processo estudado reduziu em até 87,5 % em relação à concentração inicial.

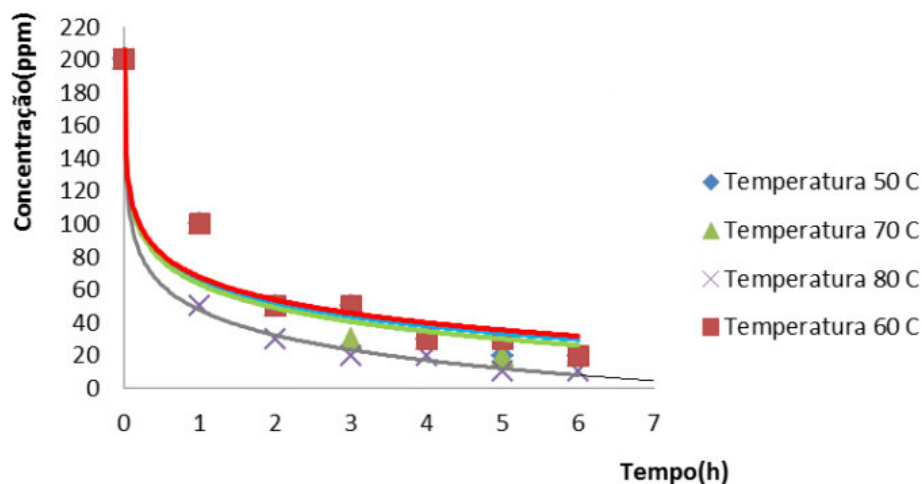


Figura 14 – Remoção de cianeto total em função do tempo (h) em temperaturas constantes.
Fonte: Rebouças et al. (2015)

Em estudo realizado por Garcia et al. (2014) analisou os parâmetros característicos da manipueira coletada na região de Sergipe. Na Tabela 9 estão ilustradas as médias dos resultados das três amostras analisadas pelo autor.

Tabela 9 - Características químicas da manipueira		
Parâmetros (mg.L ⁻¹)		
DQO		724,7
Nitrogênio total		666,3
Fósforo total		202,3
Sólidos suspensos		943,7
pH		6,2
Potássio		1779,0
Cianeto total		411,9
Cianeto total		37,3

Para Araújo (2016) o uso da manipueira como suplemento alimentar para as microalgas é mais que uma forma de aumento de produtividade, pois com o seu aproveitamento deixam de ser descartados no meio ambiente (rios e solos) poluindo-os.

As microalgas são capazes de produzir metabólitos valiosos, como proteínas, ácidos graxos e carboidratos para aditivos de rações e produtos para a saúde. Além disso, a capacidade de crescer em meio alcalino reduz os riscos de contaminação por outros microorganismos (Ak, 2012).

No entanto, o alto custo do cultivo de microalgas tem limitado o desenvolvimento em larga escala de produção. Aproximadamente 80% dos custos totais para o cultivo de microalgas estão associados consumo excessivo de nutrientes e água (Luo et al., 2016).

2.5. COLHEITA E BIOMASSA

A produção de biomassa através de microalgas vem se tornando uma alternativa para a geração de produtos de interesse no mercado industrial. Através desse tipo biomassa é possível se extrair diversos produtos como óleos, carotenoides e polissacarídeos.

O rápido desenvolvimento da biomassa de microalgas como fonte alternativa de recursos energéticos vem se desenvolvendo ao longo de um período de tempo. O processo de produção de microalgas ainda está em fase de desenvolvimento quando comparado ao combustível fóssil, pois ainda existem alguns gargalos de produção que inibem a eficiência do processo industrial. Segundo (Onumaegbu et al., 2018) o interesse no desenvolvimento de microalgas é devido acumulação de lípidos, não lutando com terras agrícolas e o poder de crescimento durante o período de cultura. Apesar disso ainda há dificuldades no processo no desenvolvimento em grande escala pois consomem muita energia durante o processo de extração de lipídios.

As microalgas têm recebido considerável atenção nos últimos anos como uma das fontes mais promissoras de biomassa sustentável para a produção de combustíveis e produtos químicos (Asomaning et al., 2018). As microalgas apresentam várias vantagens sobre as culturas terrestres para a produção sustentável de biomassa. Em primeiro lugar, as microalgas não requerem solo e são capazes de produzir crescimento fotossintético usando luz solar, dióxido de carbono, água e sais inorgânicos como seus principais nutrientes, permitindo um processo de crescimento potencialmente negativo ao carbono. As algas também são capazes de produzir uma variedade de bioquímicos desejáveis para uma variedade de indústrias, mas de particular interesse é o acúmulo de lípidos por microalgas para a produção de biodiesel (Cesário et al., 2018). No entanto, embora sejam capazes de taxas de crescimento superiores às culturas tradicionais utilizadas para a produção de biodiesel, como soja, sua baixa densidade celular global em seus meios de crescimento líquido apresenta alguns desafios para o processamento posterior (Faried et al., 2017). Até agora, isso

limitou suas aplicações em escala comercial a um punhado de produtos de alta qualidade, como o carotenóide *astaxantina*, ou como fonte de proteína e antioxidantes.

Após o cultivo das microalgas, é necessário realizar pré-etape de separação sólido-líquido dos cultivos, essa etapa é conhecida como colheita de biomassa e serve para concentrar e recuperar a biomassa a ser processada. Usualmente a etapa de colheita pode ser feita através da coagulação, filtração ou centrifugação, esta que se destaca por deixar uma menor quantidade de água na biomassa. (ANDRADE *et al*, 2014).

Os principais métodos de separação da biomassa algal são: centrifugação, filtração e floculação química. Centrifugação é um processo de separação de misturas utilizado para acelerar a decantação ou sedimentação, onde o corpo mais denso da mistura sólido-líquida deposita-se no fundo do recipiente devido à ação da gravidade (Cruz, 2017). A filtração também pode ser empregada no processo de colheita da bioma de microalga, sendo utilizado comumente em grande escala para microalga relativamente grandes, porém para microalgas cujo tamanho celular é menor, a filtração não se mostra eficiente (Lima, 2016). A floculação química é um meio eficiente e econômico para a coleta de microalgas, pois aumenta o tamanho das partículas, facilitando sua remoção. A coleta de microalgas por floculação é mais eficiente que outras técnicas convencionais, a qual permite que grandes quantidades de culturas sejam tratadas de uma só vez (Gris, 2014).

2.6. PRÉ-TRATAMENTO PARA EXTRAÇÃO

Ramluckan et al. (2014) afirmam que o primeiro passo no progresso da produção de biodiesel é desenvolver métodos de rompimento da célula e extração do lipídio. O lipídio é um produto intracelular e por isso, torna-se necessário promover o rompimento da parede celular (lise celular) para que haja a extração do lipídio.

O método convencional de extração de lipídios é demorado e tem baixa eficiência. Para reduzir o uso de solventes orgânicos, reduzir o tempo de extração e para maiores eficiências de extração, os esforços estão sendo concentrados em explorar abordagens de pré-tratamento da biomassa de algas. O pré-tratamento da biomassa de algas visa a ruptura de células de algas usando abordagens mecânicas, químicas ou biológicas, Isso ajuda na liberação eficiente de lipídios intracelulares no meio solvente seguido de sua recuperação (Rasul et al., 2017). Embora esta

abordagem não tenha conseguido eliminar o uso de solventes orgânicos somente reduziu seu uso, e também aumentou a eficiência do processo global.

Entre os métodos de lise celular estão o uso das micro-ondas, ultrassom e autoclave. O rompimento das células através das microondas consiste em quebrar as células através do choque de ondas de alta frequência. Tratando-se do pré-tratamento com ultrassom, o rompimento da membrana celular deve-se a um efeito de cavitação que perturba as células microbianas. A realização da lise celular na autoclave é promovida pelo calor úmido que desestabiliza a membrana citoplasmática e rompe-a (Lee et al., 2010). Os resultados obtidos por Lee et al. (2010) na Figura 15 constata o uso de microondas como o melhor para promover o rompimento da célula.

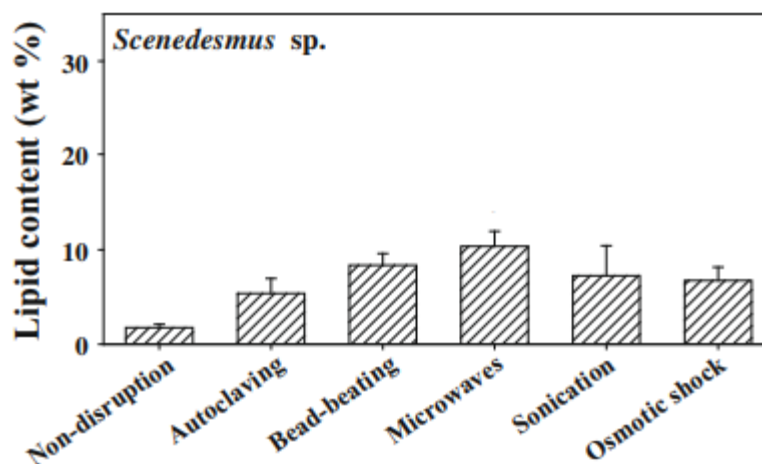


Figura 15 - Comparação dos tipos de técnicas para o rompimento celular aplicado à microalga *Scenedesmus sp.*

Fonte: Lee et al. (2010)

Conforme Lee et al. (2010), o efeito do ultrassom no pré-tratamento causa o rompimento da membrana celular devido a um efeito de cavitação, que perturba as células microbianas rompendo-as. No caso da autoclave, a alta pressão promovida por um maior espaço de tempo garante uma desestabilização da membrana citoplasmática da célula, permitindo a liberação de mais lipídios para serem extraídos por solvente. Além disso, esse método coagula proteínas, reduzindo a sua solubilização no sistema de solventes, o que sugere um lipídio extraído mais puro, quando se utiliza uma microfiltração.

2.6.1. Microondas

A técnica de microondas emite radiação eletromagnética com uma faixa de frequência de 0,3 a 300 GHz. Têm sido amplamente utilizado em indústrias alimentícias e farmacêuticas para secagem e extração de componentes intracelulares. A extração assistida por micro-ondas é basicamente um tipo sem contato que envolve a quebra uniforme do material alvo pelo uso de microondas (Wahidin et al., 2014). Eles interagem selectivamente com as moléculas polares (por exemplo, água) e induzem o aquecimento intracelular. Esse calor e pressão localizados induz danos à membrana celular, extraindo o lípidos intracelulares (Bundhoo, 2018).

O pré-tratamento com microondas durante a extração com solvente mostrou aumento significativo nos rendimentos lipídicos da biomassa de algas seca e úmida, em comparação com a extração direta de solvente (Wahidin et al., 2014). Juntamente com maiores rendimentos lipídicos, este método oferece uma notável vantagem do tempo de processamento reduzido.

2.6.2. Autoclave

O método de ruptura da célula via autoclave inclui utilizar uma câmara onde a água é aquecida até 121°C e fica pressurizada a uma pressão manométrica de aproximadamente 101,35 kPa. O mecanismo é semelhante ao utilizado na técnica de micro-ondas, porém, na autoclave o calor que é transmitido para a célula é de fora para dentro do microrganismo, enquanto que no método utilizando micro-ondas é o oposto (Lee et al., 2015).

Lee et al. (2010) em seus experimentos, chegaram a bons resultados para ruptura da célula com o uso da autoclave, mas apenas com uma das espécies testadas. No entanto, Lee et al. (2017) afirmam que a efetividade do método é baixa por causa da parede celular, que é mais facilmente rompida de dentro para fora, como ocorre no tratamento com micro-ondas.

2.6.3. Ultrassom

O pré-tratamento por ultra-som tem sido usado para extrair os componentes intracelulares por décadas (Khanal et al., 2007). A ruptura das células ocorre através de dois mecanismos, a cavitação e efeitos mecano-acústicos induzidos pelo ultra-som. Quando a onda sonora com uma frequência acima do intervalo de audição normal de humanos (> 20 kHz) se propaga no meio de cultura, gera padrões repetitivos de compressões (regiões de alta pressão) e rarefações (regiões de

baixa pressão). Como resultado da pressão reduzida, microbolhas são formadas nas regiões de rarefação e, eventualmente, colapso emitindo uma onda de choque. Isso leva a ruptura citoplasmática dividindo os corpos celulares abertos (Greenly and Tester, 2015) (Lee et al., 2015). Um aumento no rendimento de óleo por 50-500%, juntamente com redução de 10 vezes no tempo de extração pode ser conseguido utilizando tecnologia assistida por ultra-sons (Zhang et al., 2014) (Suali and Sarbatly, 2012). Este método mostrou eficiência de extração lipídica ($19,49 \pm 3,30\%$), comparável método de microondas ($20,73 \pm 4,16\%$), com biomassa seca de *Scenedesmus sp.* (Ansari et al., 2018).

Segundo Lee et al. (2017) a temperatura do banho, o tempo de exposição, adição de perolas de vidro e viscosidade da suspensão da biomassa são fatores que influenciam a eficiência da ruptura celular. Quanto maior a temperatura do banho, menor a pressão de vapor do líquido, aumentando as chances de uma bolha mais rápida colidir com uma célula, causando maior cisalhamento, em relação ao tempo, quanto maior o tempo de exposição maior o número de células que serão rompidas, a adição de perolas de vidro promovem uma maior força de colisão e as baixas viscosidades permitem a ação mais efetiva das bolhas.

A Figura 16 mostra os efeitos do pré-tratamento de ultrassom a quente em uma imagem de microscopia eletrônica de varredura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As células em A estão sem nenhuma ruptura, após passarem pelo pré-tratamento, orifícios aparecem na superfície da célula.

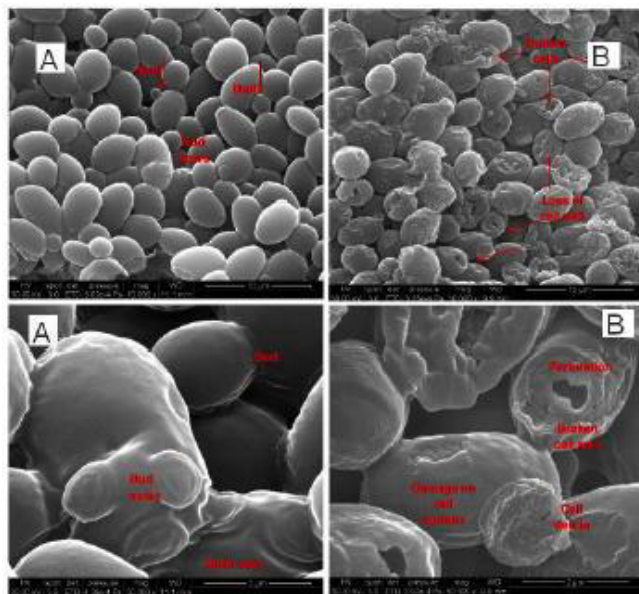


Figura 16 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura da *Saccharomyces cerevisiae* (A) antes do pré-tratamento com ultrassom a quente e (B) após o procedimento.

Fonte: Marx et al. (2011)

As conclusões sobre o uso de ultrassom como pré-tratamento ainda são bem diferenciadas, Morioka et al. (2014) teve seu rendimento dobrado que utilizado o pré-tratamento com ultrassom, Alves (2016) concluiu que dentre os métodos estudados o de ultrassom é o que proporciona a melhor extração e baseou sua pesquisa nos diferentes tempos de exposição ao banho, já Lee et al. (2015) não obtiveram resultados significativos quanto a utilização da técnica.

2.7. EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

De acordo com Mota et al. (2012), o processo de extração requer várias etapas com o objetivo de obter maior eficiência e rendimento. Para isso, pode-se utilizar recursos como enzimas, solventes químicos ou fluido supercrítico, no qual o dióxido de carbono sofre pressão e aquecimento funcionando como um solvente.

Dentre os mais variados métodos de extração existentes, destacam-se os métodos de extração por solvente, visto que há uma grande facilidade de recuperação do solvente, baixo custo e praticidade (Zorn et al., 2017). O processo de extração por solvente consiste em transferir constituintes solúveis contidos em uma matriz graxa para um solvente que esteja em contato, sendo um processo puramente físico e pode ser realizado através de diversas técnicas utilizando solventes puros ou misturas (Brum and ARRUDA, 2009).

Lipídeos polares como fosfolipídeos e glicolipídeos requerem solventes com polares, tais como etanol ou metanol, para enfraquecer ligações de hidrogênio que os mantêm (Recalcatti, 2016). Em microalgas, a fração lipídica pode sofrer alterações em sua composição de acordo com a polaridade do solvente utilizado para sua extração. A Tabela 10 apresenta a composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator (Cohen, 2014).

Tabela 10 - Composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator

Solvente	Componentes extraídos
Clorofórmio	hidrocarbonetos, carotenóides, clorofila, esteróis, triacilgliceróis, ceras, aldeídos e ácidos graxos
Acetona	diacilgliceróis, cerebrosídeos e sulfolipídeos
Metanol	fosfolipídeos e glicolipídeos
Hexano	hidrocarbonetos, Triacilgliceróis e ácidos graxos

Fonte: Cohen (2014)

A solubilidade dos lipídios está diretamente ligada com a estrutura molecular dos compostos envolvidos na mistura, bem como às duas formas de associações que ocorrem para os lipídios quanto à polaridade são representadas por forças de Wan Der Walls e as ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas. Desta forma, é importante analisar dois parâmetros quanto à polaridade: o momento dipolo (μ) e a constante dielétrica (ϵ).

O momento dipolo, segundo Solomons and Fryhle (2000), é uma propriedade física que serve para indicar a polaridade da molécula por meio do somatório dos vetores de polaridade. Basicamente, uma molécula apolar possui μ igual a zero, pois todos os vetores de polaridade de uma mesma molécula se anulam; já para molécula polares, o momento dipolo é diferente de zero ($\mu \neq 0$). Quanto à constante dielétrica, se trata de uma medida aproximada da polaridade, que mede as atrações e repulsões eletrostáticas entre íons que são proporcionais ao valor dessa constante. A Tabela 11 contém os valores dessas constantes para os solventes utilizados (Solomons and Fryhle, 2000).

Tabela 11 - Parâmetros quanto à polaridade para os solventes utilizados

Solvente	Fórmula	μ	ϵ
Clorofórmio	CHCl_3	1,01	4,81
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	1,69	24,3
Metanol	CH_3OH	1,7	32,6
Água	H_2O	1,85	78,5

Fonte: Adaptado Viêgas (2010).

O clorofórmio é um solvente que, por apresentar caráter polar-apolar é capaz de extrair os lipídios apolares, conhecidos como triacilgliceróis associados pelas forças de Wan Der Walls, como também os ácidos graxos que possuem polaridades variadas.

Quanto ao etanol e ao metanol, ambos são solventes polares, capazes de extrair os fosfolipídios e glicolipídios através do enfraquecimento das ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas que atuam sobre esses lipídios polares. A Tabela 12 a seguir dispõe dos dados da composição do óleo extraído sob influência do solvente utilizado.

Tabela 12 - Composição do óleo extraído de acordo com o solvente utilizado

Solvente	Componentes extraídos
Clorofórmio	Clorofila, triacilgliceróis e ácidos graxos
Metanol/Etanol	Fosfolipídios e glicolopídeos

Fonte: Adaptado Viêgas (2010).

A Tabela 13 contém os dados de solubilidade dos solventes usados encontrados no Chemical Engineers' Handbook (Green, 2008)

Tabela 13 - Tabela de Solubilidade do clorofórmio, etanol e metanol

Substância	Solubilidade (g/100 g de água)	
	Em água	Em álcool
Clorofórmio	0,82*	∞
Etanol	∞	-
Metanol	∞	∞

Fonte: Green (2008)

* Na temperatura de 20°C

Diante dos dados apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13, o metanol e o etanol aliam-se tanto à água quanto ao clorofórmio, sendo que o lipídio está predominantemente contido na fase formada por clorofórmio/metanol ou clorofórmio/etanol, garantindo uma maior recuperação dos mesmos (lipídios polares e apolares).

Os lipídios costumam ser fracamente polares com constantes dielétricas na faixa de 2 a 4, portanto, solventes menos polares rendem maiores taxas de solubilização dos lipídios (Galvão et al., 2013). Em estudos propostos por Ramluckan et al. (2014) as extrações são realizadas com diversos solventes e constata melhores resultados com o etanol, assim como mostra a Figura 17.

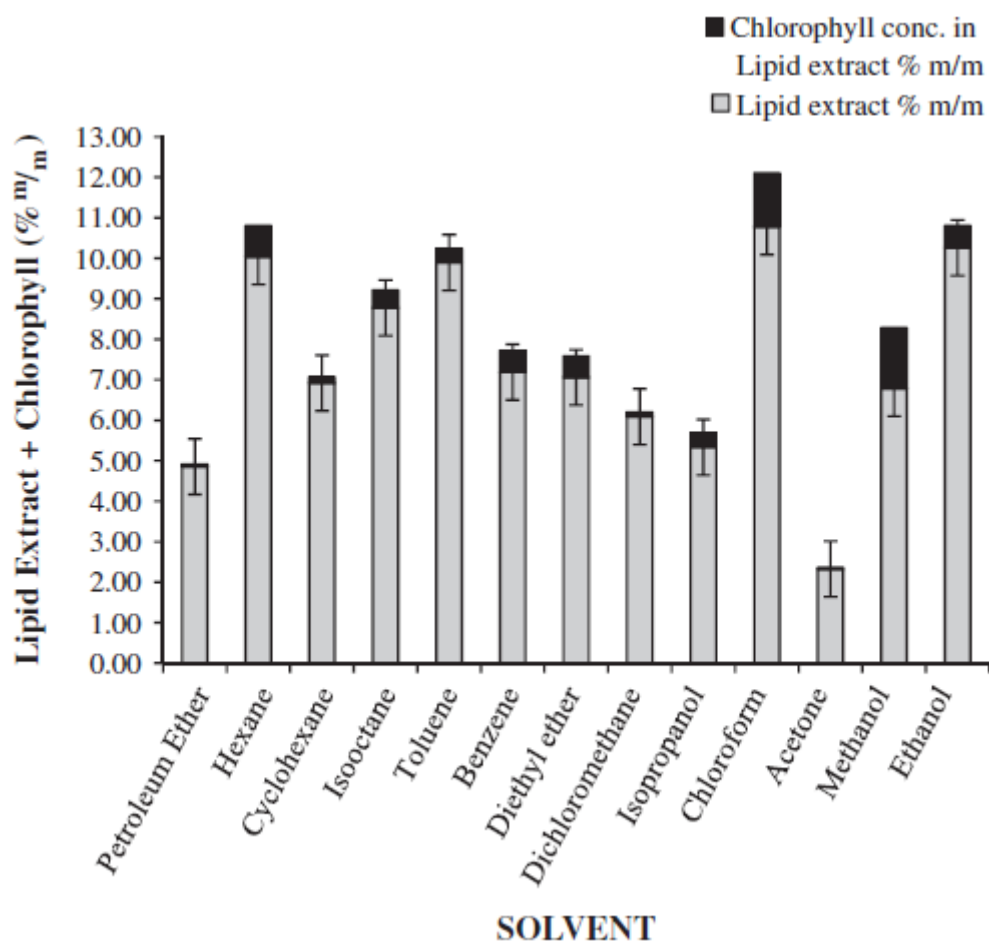


Figura 17 - Concentração de lipídios e clorofila obtidas pela extração *Soxhlet* utilizando 13 solventes. Fonte: Ramluckan et al. (2014).

O etanol teve resultados superiores ao metanol, com a vantagem de remover uma menor quantidade de clorofila, pigmento que também é extraído em pequenas quantidades na extração de lipídios, além de ter uma toxicidade menor que o metanol, facilitando, portanto, a sua implementação industrial (Galvão et al., 2013).

Observando os resultados da Figura 17, nota-se que dentre os demais solventes, apenas o hexano e tolueno tiveram resultados próximos, porém ambos os solventes são extremamente tóxicos e prejudiciais à saúde, com o agravante de serem derivados da exploração do petróleo, atividade que busca reduzir com o surgimento de novas fontes de combustíveis. Em contrapartida,

tanto o etanol quanto o metanol são biodegradáveis e oriundos de fontes renováveis (Tanamati et al., 2010).

A combinação do clorofórmio e etanol em proporções iguais corresponde à melhor eficiência de remoção (Figura 18).

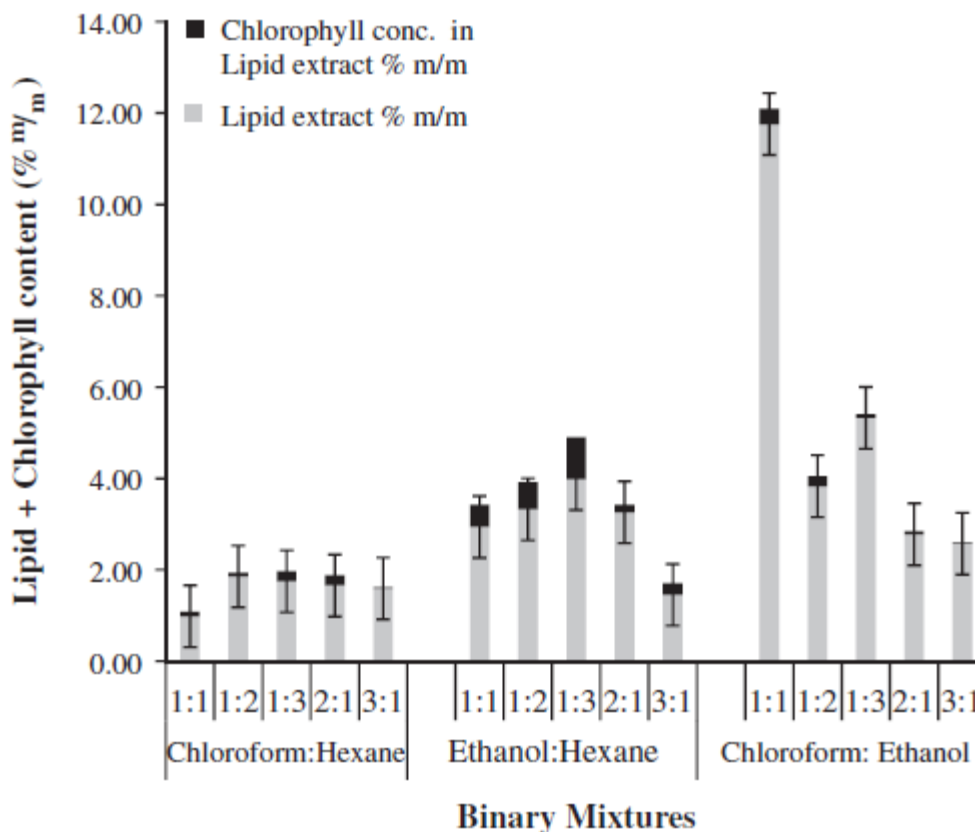


Figura 18 - Comparação dos melhores solventes em sistemas binários e suas respectivas porcentagens de lipídios e clorofila.

Fonte: Ramluckan et al. (2014)

Hidalgo et al. (2016) mostram um aumento nos rendimentos de lipídios e extração de lipídios esterilizáveis quando misturas de solventes não polares e polares foram utilizadas. O rendimento mais alto de extração de lipídios esterificados foi 19,2% (com base na biomassa seca) usando uma mistura de clorofórmio-metanol (75% v/v de metanol), correspondendo a uma extração de lipídios esterilizável a 98,9% em peso.

As análises da Figura 18 mostraram que etanol, clorofórmio e hexano são geralmente mais eficientes na extração de lipídios do que os outros solventes estudados, produzindo um conteúdo

lipídico superior a 10%. Nos testes de Ramluckan et al. (2014) a mistura binária de solventes com a maior eficiência de extração foi obtida com a mistura 1: 1 de clorofórmio: etanol.

2.7.1. *Soxhlet*

Um método muito estudado é de *Soxhlet*, no qual há uma constante renovação do solvente em contato com a matriz graxa e suas principais vantagens consistem em uma alta temperatura que o sistema pode atingir por conta da evaporação e não necessitar de filtração. Nesse método deve-se evitar o refluxo por muitas horas devido a possíveis reações de peroxidação e hidrólise dos lipídios (Costa, 2016).

A extração de lipídios é uma determinação importante em estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais dos mais diversos tipos de alimentos e, portanto, deve ser realizada com precisão. Dentre as metodologias de extração a quente, destaca-se a feita em equipamento tipo *soxhlet*. O primeiro aparelho foi desenvolvido por Franz Von *Soxhlet* em 1879, e ressaltou a importância do grau de trituração da amostra quanto à duração e eficácia do processo (Soxhlet, 1879). Consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano), devido à evaporação e subsequente condensação do solvente aquecido dentro do balão que está na base do aparelho (Schneider, 1980).

Algumas amostras requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, pois fatores como a extração dos componentes não lipídicos e a oxidação indesejada podem influenciar a qualidade final da fração lipídica. Os procedimentos clássicos idealizados por *Soxhlet* em 1879, com refluxo de solvente por muitas horas, devem ser evitados, já que favorecem as reações de peroxidação e de hidrólise (Kates, 1986), podendo comprometer resultados analíticos posteriores, como a quantificação de certos componentes lipídicos.

Os principais inconvenientes que o método de *Soxhlet* apresenta são o longo tempo requerido para a extração e o grande volume de solvente utilizado, o qual não é somente de alto custo, mas também pode ser nocivo à saúde e ao meio ambiente (De Castro and Garcia-Ayuso, 1998).

As mais notáveis vantagens que o método de *Soxhlet* apresenta são: as amostras estarem sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante; é uma metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da miscela após o término da extração, pois a amostra esteve envolta no cartucho durante todo o procedimento (REGITANO and MAB, 1987).

O método de *soxhlet* é o mais utilizado para extração de óleos devido a sua grande eficiência apresentada perante as matrizes vegetais e animais. A Tabela 14 traz algumas referências encontradas na literatura com as proporções de solventes e tempos utilizados para o processo de extração dos lipídeos de microalgas.

Tabela 14 - Procedimento de extração e rendimento de extração de algumas microalgas

Microalga	Tipo de Solventes	Tempo (min.)	Lipídeos extraídos (%)
<i>Botryococcus sp.</i>	Clorofórmio:metanol (1:1)	3 x 20	11,5
<i>Scenedemus sp.</i>	Clorofórmio:metanol (1:1)	3 x 20	11,1
<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofórmio:metanol (1:1)	3 x 20	9,5
<i>Oedogonium sp.</i>	Hexano:éter (1:1)	1440	9,4
<i>Spirogyra sp.</i>	Hexano:éter (1:1)	1440	7,3

Fonte: Lee et al. (1998) Hossain et al. (2008)

Ramluckan et al. (2014) e da Silva and Silva (2016) fizeram um estudo aprofundado do método de *Soxhlet* utilizando solventes puros e misturas, variando os tempos totais de refluxo. Para uma melhor análise das amostras realizou-se a cromatografia, visto que a extração por solvente possui a desvantagem de extrair outros compostos da biomassa, especialmente alguns pigmentos. Através desse estudo pôde-se concluir que a porcentagem de lipídios extraídos é maior utilizando misturas de solventes, o tempo ideal de extração é 3 horas e o sistema clorofórmio e etanol (1:1) apresentou melhores resultados e uma remoção de clorofila correspondente a menos de 0,5%.

2.7.2. Bligh and Dyer (1959)

Um dos procedimentos de extração mais versáteis e efetivos, que supera as dificuldades do método de *soxhlet*, é a metodologia de Bligh and Dyer (1959), uma versão simplificada do procedimento clássico usando clorofórmio-metanol proposto por (Folch et al., 1951). O método de extração de Bligh-Dyer foi desenvolvido como um método rápido para isolar lipídios no músculo

do peixe com reduzida quantidade de solvente usado no Folch extrações (Berndmeyer et al., 2014). Uma razão para a popularidade desses dois métodos é que uma combinação de metanol e clorofórmio é usado para extrair de forma não seletiva e reprodutível uma ampla gama de classes de variedade de matrizes de amostras.

Uma das vantagens do método desenvolvido por Bligh e Dyer é a formação de um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água) (Bligh and Dyer, 1959). A determinação das solubilidades de cada componente pode ser avaliada através de um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos parcialmente miscíveis entre si (clorofórmio e água) com um terceiro (metanol), completamente miscível nos outros dois.

Uma das técnicas empregadas para determinar dados de Equilíbrio Líquido-Líquido (ELL) consiste em conhecer as propriedades, por exemplo densidade e índice de refração, dos pontos da curva binodal e das fases em equilíbrio. A quantificação das fases é possibilitada pela construção de curvas de calibração que relacionam as frações mássicas dos compostos das amostras obtidas na curva binodal com propriedades inerentes às amostras. Assim, após o sistema analisado separar as fases e atingir o equilíbrio, amostras de ambas as fases são analisadas em relação às propriedades e, posteriormente, utilizando os valores das propriedades de cada fase, é possível determinar as composições de cada componente pela correlação obtida para a curva binodal (Treybal, 1963, Treybal, 1981, Seader et al., 1998).

A forma mais direta de representar as relações de equilíbrio líquido/líquido é no Diagrama Triangular (normalmente o triângulo equilátero) dado perante sistemas ternários (C+A+B) e as várias correntes serem, como tal, misturas ternárias.

Na Figura 19 está representada num diagrama ternário a curva de equilíbrio líquido/líquido (Curva Binodal) que é o *locus* de todas as correntes de extracto (zona direita da curva) e de resíduo (zona esquerda da curva) em equilíbrio. Os vértices do triângulo correspondem aos componentes puros (A, B, C), e os lados às misturas binárias. No diagrama triangular as composições são normalmente dadas em fracções mássicas. O ponto P é designado por Ponto Crítico ou *Plait Point* e corresponde a ter um extracto e um resíduo em equilíbrio com a mesma

composição, o que implica que, para estas condições, a extração é impossível. No diagrama triangular estão também representadas as linhas que unem os extractos e os resíduos em equilíbrio, as quais se designam por *Tie-Lines* (Robbins, 1980).

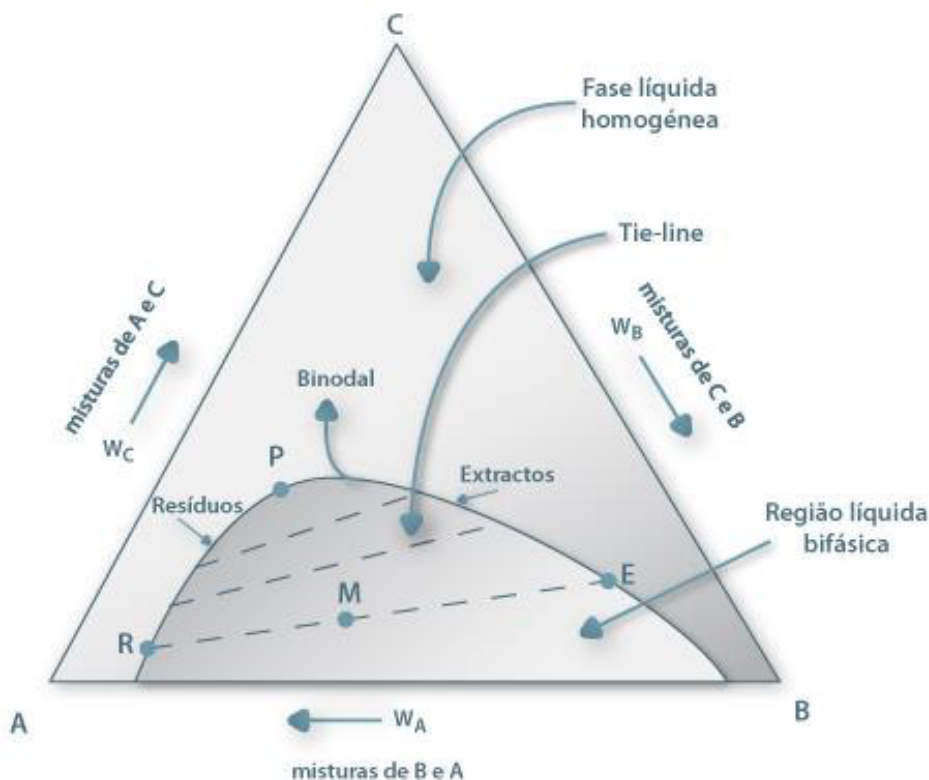


Figura 19- Representação gráfica dos dados de Equilíbrio Líquido-Líquido para um sistema do tipo diagrama triângulo equilátero
Fonte: Robbins (1980)

A curva binodal separa a zona de miscibilidade parcial dos componentes A e B (abaixo da binodal), da zona de miscibilidade total (acima da binodal).

Nos últimos anos diversos pesquisadores realizaram trabalhos Undeland et al. (1998), Iverson et al. (2001), Fishwick and Wright (1977), Hara and Radin (1978), Sahasrabudhe (1982), Gunnlaugsdottir and Ackman (1993), em que o objetivo foi encontrar o método mais eficiente para a obtenção da fração lipídica desejada e determinar sua composição. Além disso, também buscaram métodos que não alterassem a qualidade do óleo e utilizassem solventes menos tóxicos que a mistura clorofórmio e metanol (Nelson and Perkins, 1991), (Bligh and Dyer, 1959), (Folch et al., 1951). No entanto, devido à alta eficiência que este sistema apresenta na extração de

lipídios polares e apolares, nenhuma mistura alternativa testada recentemente tem obtido o êxito esperado, ou seja, uma eficiência equivalente ao sistema que utiliza um solvente clorado.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver o cultivo de microalga em manipueira, como complemento do meio de cultivo sintético, buscando uma produtividade de biomassa e lipídios semelhante ao do meio sintético ASM-1, a fim de reduzir o custo da produção de biodiesel.

3.1.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, o trabalho foi dividido em diferentes objetivos específicos: padronizar o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meio sintético ASM-1 para definição das concentrações de nitrogênio, fosforo, tempo de exposição a luz, período de cultivo e produção de biomassa; cultivar microalgas em meio de cultivo alternativo formulado a partir de diluições de manipueira em ASM-1; estabelecer a melhor técnica de extração de lipídios, combinando o pré-tratamento e sistemas de solventes, utilizando a biomassa seca; comparar a produtividade de biomassa e lipídios totais dos cultivos em meio ASM-1 com o meio alternativo; analisar o perfil lipídico da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio ASM-1 e em meios suplementados com manipueira.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICROALGA

A espécie de microalga utilizada neste estudo foi uma *Scenedesmus* sp. obtida de uma amostra fornecida pelo banco de cepas do Laboratório de biotecnologia (LABAM) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), os meios foram preparados com reagentes analíticos de 98% de pureza e água destilada, armazenadas em frascos âmbar e mantidos em temperatura ambiente..

4.2. MEIO DE CULTURA

4.2.1.Meio ASM-1

Depois de identificado dentre os diversos tipos de meio sintético o de melhor adaptação e crescimento para a microalga *Scenedesmus* sp. foi feito modificações a fim de encontrar a melhor condição de produção de biomassa.

No laboratório, as microalgas foram cultivadas em meio de cultura ASM-1 nas concentrações padrão (Gorham et al., 1964) de composição ilustrada na Tabela 15 em frascos de 500 mL.

Tabela 15- Composição do meio sintético ASM-1 padrão em (mg L ⁻¹)	
Nutriente	Concentração (mg.L ⁻¹)
NaNO ₃	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	49
MgCl ₂ .6H ₂ O	41
CaCl ₂ .2H ₂ O	29
KH ₂ PO ₄	8,7
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	17,8
FeCl ₃	0,65
H ₃ BO ₃	2,48
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39
ZnCl ₂	0,33
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,049
CuCl	0,0014
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	8,24

4.2.2. Meio com efluente da produção de farinha decantado

Muitos efluentes mesmo depois de passarem por processos de biodigestão, possuem elevadas concentrações de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), sólidos em suspensão e nutrientes (nitrogênio e fósforo). Isto representa uma fonte de nutrientes, mas também uma fonte potencial de poluição ambiental quando não tratado ou manejado inadequadamente.

A manipueira utilizada nessa pesquisa para suplementar o meio de cultivo sintético foi coletado nas casas de farinha da região de Riachão do Dantas, município brasileiro do estado de Sergipe (latitude 11°04'08" sul e a uma longitude 37°43'30" oeste). O efluente coletado foi transportado em recipiente de plástico de 20 litros, e posteriormente armazenados em frascos de plásticos menores, todos esterilizados, mantidos em refrigerador (-10 °C) para conservar suas características físico-químicas. A Tabela 16 apresenta a composição do resíduo manipueira utilizado como suplemento do meio de cultura sintético.

Tabela 16 - Composição da manipueira utilizada neste trabalho

Componentes	Concentração
Amido (%)	6,1
Carboidratos (%)	3,64
Açúcares redutores (g/100mL)	2,04
Açúcares não redutores (g/100mL)	1,53
Açúcar invertido (g/100L)	2,04
Nitrogênio total (mg/L)	2240
Fósforo total (mg/L)	461
Enxofre total (mg/L)	0,010
Zinco total (mg/L)	0,081
Manganês total (mg/L)	0,500
Ferro total (mg/L)	0,701
Cobre total (mg/L)	0,021
Cálcio total (mg/L)	25,63
Magnésio (mg/L)	33,20
Potássio (mg/L)	11,02
Cianeto total (mg/L)	48,6
pH	6,4

Os meios preparados com efluente foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão, filtrados e diluídos em várias concentrações, como mostra Tabela 17, para serem esterilizados, diminuir a carga orgânica, eliminar o cianeto que poderia ainda estar presente no meio e reduzir a turbidez do efluente e, assim, não ocorrer dispersão da iluminação no meio, e permitir verificar em

qual concentração a microalga teria um desenvolvimento semelhante ou superior ao do meio ASM-1.

Tabela 17 - Diferentes concentrações de manipueira diluída em meio ASM-1 para cultivo da *Scenedesmus sp.* usando fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer*

Tratamento	Efluente %
1	0*
2	5
3	10
4	20
5	40
6	60
7	80
8	100

* cultivo controle com meio ASM-1, sem adição de efluente

A turbidez do meio pode dificultar a passagem de luz, diminuindo assim a fotossíntese das células. Para diminuir esse efeito, o efluente foi centrifugado, decantado e filtrado para remoção de particulados.

4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos de microalgas foram realizados em escala laboratorial em *Erlenmeyer* com capacidade de 500 mL com um volume inicial de 400 mL de meio ASM-1 previamente autoclavados, sob fluxo luminoso constante de $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e aeração forçada constante de $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, temperatura de $26 \pm 4^\circ\text{C}$.

A concentração de biomassa em ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) dos cultivos foi determinada diariamente utilizando um espectrofotômetro para a leitura da absorbância de comprimento de onda de 750 nm. Foram realizadas leituras de absorbância para diferentes concentrações celulares, a partir destes dados foi construída uma curva de calibração, e através da equação de linearização ($y=5,7092x$), calculou-se a concentração de alga dos experimentos. Os cultivos foram mantidos até atingir o estado estacionário de crescimento e, posteriormente, centrifugados a 3000 rpm por 10 min para coleta da biomassa. A biomassa foi seca em estufa por 24h, macerada e armazenada para posterior extração.

Para determinar a quantidade em (mL) da matriz, cultura mantida em meio sintético para inoculação dos meios, a ser adicionada nos experimentos, foi quantificada a biomassa em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, em

seguida calculado o volume necessário para inocular 400 mL de cultivo com uma biomassa inicial de aproximadamente $\pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$.

A otimização do meio de cultivo sintético foi realizada em duas etapas, num primeiro momento avaliou-se a influência do nitrogênio no meio e no segundo momento a importância da luz e do fosfato para o crescimento microalgal.

4.3.1. Meio ASM-1 com padronização de nitrogênio

A microalga foi cultivada em meio ASM-1, soluções descritas na Tabela 15 com variações de nitrato nas proporções ilustradas na Tabela 18.

Tabela 18 - Níveis de nitrato do meio ASM-1 em mg.L^{-1}

Meio de cultura	Concentração nitrato (mg.L^{-1})
ASM-1	170 (concentração padrão)
ASM-1 modificado	85

As concentrações de nitrogênio foram modificadas ao longo dos experimentos nos tempos mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Variação da concentração de nitrogênio do meio ASM-1 com o tempo.

Experimento	Meio de cultura	Tempo
1	ASM-1	15 dias
2	ASM-1 + ASM-1 modificado	Meio modificado no 7º dia de cultivo
3	ASM-1 + ASM-1 modificado	Meio modificado no 10º dia de cultivo
4	ASM-1 modificado	15 dias

Os experimentos 1,2 e 3 a princípio foram mantidos em meio de cultura sintético ASM-1 nas proporções de nutrientes indicados na tabela, à medida que o nível de líquido ia reduzindo, por causa da evaporação, adicionou-se meio para manter o nível sempre constante (400 mL), nos experimentos 2 e 3 a cultura passou a ser avolumado com ASM-1 modificado, nitrogênio reduzido, no sétimo e no décimo dia, respectivamente. Os experimentos foram realizados em um cultivo contínuo e 24h de exposição a luz, afim de otimizar da melhor forma de crescimento.

4.3.2. Meio ASM-1 com otimização de luz e fósforo

As microalgas foram cultivadas em meio ASM-1 modificado, condições de nitrato otimizadas. As concentrações de fosfato utilizadas estão representadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Níveis de fosfato de cada meio em mg.L^{-1}

Tipo do Meio	Fosfato disponível (mg.L^{-1})
Meio P-	13,25
Meio P	26,5
Meio P+	39,75

Os experimentos foram realizados em fotoperíodos de 12/12h claro e escuro, um período de 18h/6h claro e escuro, por fim, um cultivo contínuo de 24h claro para comparar e otimizar a melhor forma de crescimento, conforme Tabela 21.

Tabela 21 – Níveis de experimento

Exposição a luminosidade (h)	Concentração de Fosfato (mg.L^{-1})		
12	P-	P	P+
18	P-	P	P+
24	P-	P	P+

A otimização do ciclo de fotoperíodo e da concentração de fosfato foi realizada pelo teste P, com intervalo de confiança de 95%, através do método da superfície de resposta. Os melhores resultados de fósforo obtidos foram utilizados para extração de lipídios. O fluxograma da Figura 20 ilustra o procedimento adotado para padronização do meio de cultura ASM-1.

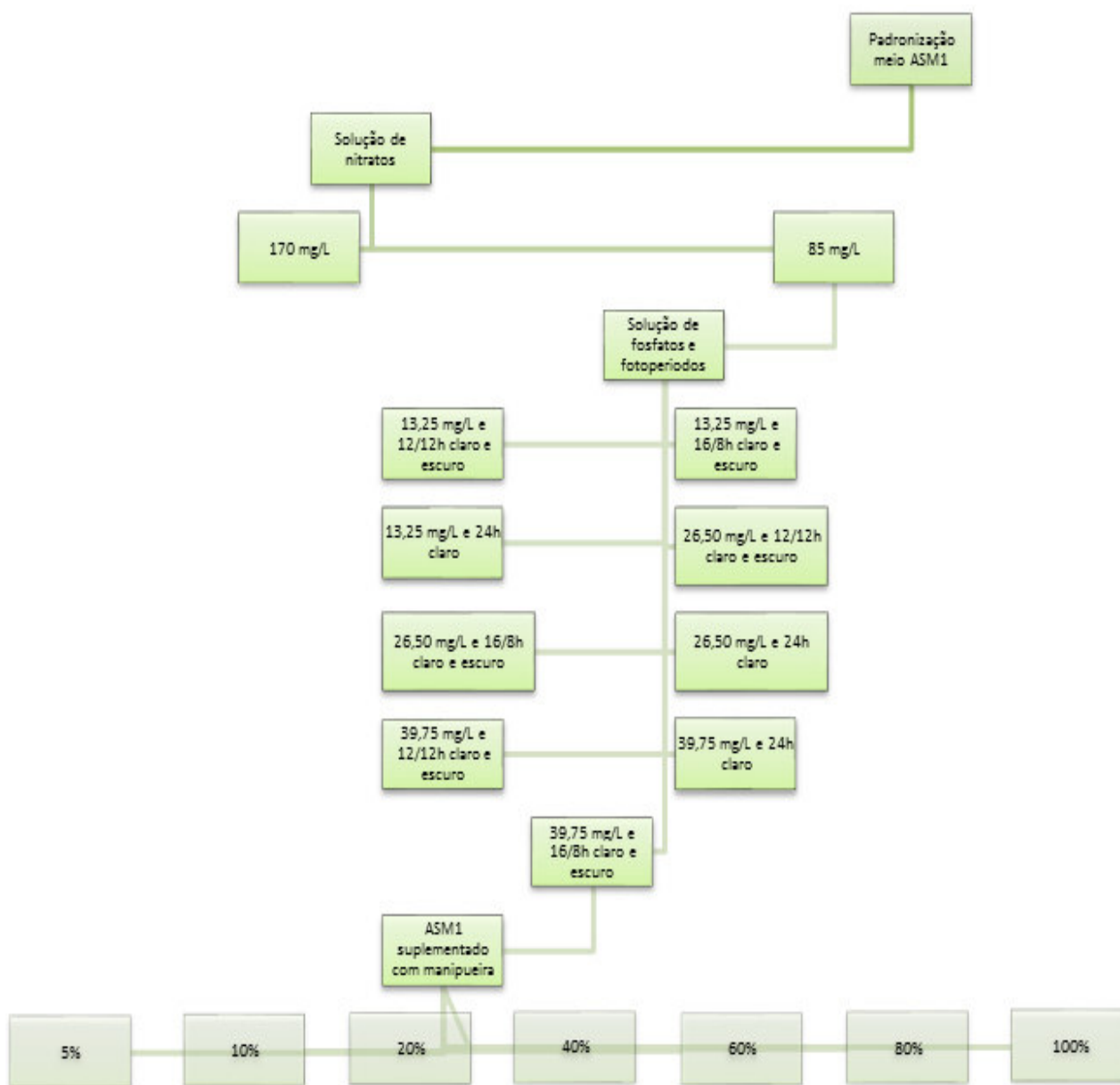


Figura 20–Fluxograma detalhado do procedimento adotado para padronização do meio de cultura ASM-1.

4.4. EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

A seguinte metodologia tem por objetivo extrair os lipídios contidos na biomassa da microalga *Scenedesmus sp.*, dentre métodos empregados estão o método proposto por Bligh and Dyer (1959) modificado com uso de ultrassom e o método de *Soxhlet* proposto por Ramluckan et al. (2014). O sistema de solventes escolhidos, assim como as proporções têm como fundamento os estudos de Ramluckan et al. (2014) que mostra as propriedades dos treze solventes usados para a

extração de lipídios da biomassa de algas. Ele ainda afirma que diferentes lipídios têm diferentes polaridades significa que é impraticável para selecionar um único solvente orgânico para extrair todos eles. Portanto, o teor lipídico total determinado por extração com solvente depende da natureza do solvente orgânico utilizado para realizar a extração.

A homogeneização proposta Bligh and Dyer (1959) foi otimizada por Zorn et al. (2017), através do emprego do ultrassom e essa adaptação foi inserida nos experimentos a seguir. O teor de umidade da biomassa aplicado no procedimento experimental deve-se à obtenção de melhores resultados da extração nos estudos de Zorn et al. (2017).

Dado que o lipídio é um produto intracelular, Zorn et al. (2017) aplicou a lise celular por ultrassom para auxiliar o processo de extração. Como proposta de melhoria nesse pré-tratamento da amostra, utiliza-se a autoclave, testada por Lee et al. (2010), com um tempo de autoclavagem maior que a metodologia por ele empregada como ilustrado na Tabela 22.

Tabela 22 - Fatores utilizados com base nos melhores resultados de Lee et al. (2010) e Zorn et al. (2017)

Fatores	
Umidade	64%
Total de solventes	33 mL
Proporção de solventes	1:1
Tempo de ultrassom	30 min
Tempo de autoclave	15 min

Para o controle da quantidade e hidratação da amostra pesou-se 1 g da biomassa seca em um *Erlenmeyer* de 125 mL. A massa foi hidratada com 64% de umidade e os solventes na proporção 1:1 totalizando 33mL de solventes, os parâmetros e métodos utilizados para extração estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23 - Parâmetros e métodos a serem utilizados na extração

Pré-tratamentos	30 min ultrassom 15 min autoclave
Sistemas de solventes	CM - Clorofórmio / Metanol (1:1) CE - Clorofórmio / Etanol (1:1)
Métodos de extração	Bligh and Dyer (1959) com ultrassom Soxhlet

Para promover a quebra da estrutura da célula, conhecida como lise celular, dois tipos de pré-tratamento foram utilizados: ultrassom, amostra devidamente hidratada foi colocada no banho

à temperatura ambiente com ultrassom durante 30 minutos; autoclave, o *Erlenmeyer* contendo a amostra hidratada será colocado na autoclave sobre pressão de 1atm e temperatura de 121°C durante 15 minutos.

No processo de extração Bligh and Dyer (1959) adaptado acrescenta-se à amostra hidratada, o clorofórmio e o metanol (ou etanol) nas proporções e volumes totais pré-estabelecidas na Tabela 6, agitou-se o sistema manualmente por 2 minutos e em seguida adicionou-se em banho de ultrassom à temperatura ambiente por 25 minutos, retirou-se o *Erlenmeyer* do ultrassom e repetiu-se o procedimento de agitação e ultrassom três vezes.

Na extração por *soxhlet* a amostra hidratada de acordo com o planejamento experimental é adicionada ao balão de 100 mL do sistema de solvente na proporção 1:1 previamente estabelecida. Colocou-se a mistura no sistema *Soxhlet*. O tempo de extração foi de 3h, conforme estudos de Ramluckan et al. (2014) ilustrado na Figura 21.

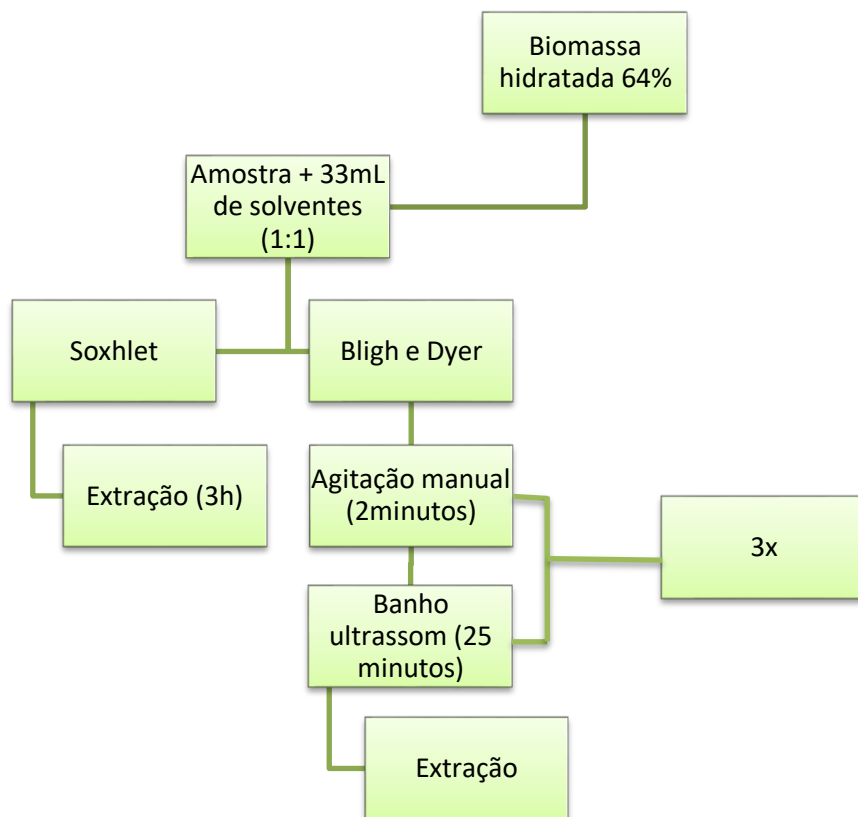


Figura 21 – Fluxograma procedimento de extração pelo método de Bligh and Dyer (1959) e *Soxhlet*.

Após a extração o conteúdo foi filtrado com papel de filtro de diâmetro médio de 12,5 cm em Erlenmeyer, em seguida o filtrado coletado e transferido para um funil de separação de 125 mL e deixado em repouso até a completa separação das fases. Após separação, a fase inferior do funil, correspondente ao solvente, para ambos os processos, foi removida e evaporada em estufa a uma temperatura de 55 - 60°C durante 24 h. O conteúdo foi então dessecado e resfriado até a temperatura ambiente durante 15 minutos, para depois ser pesado novamente para determinação dos lipídios totais extraídos, como ilustrado na Figura 22.

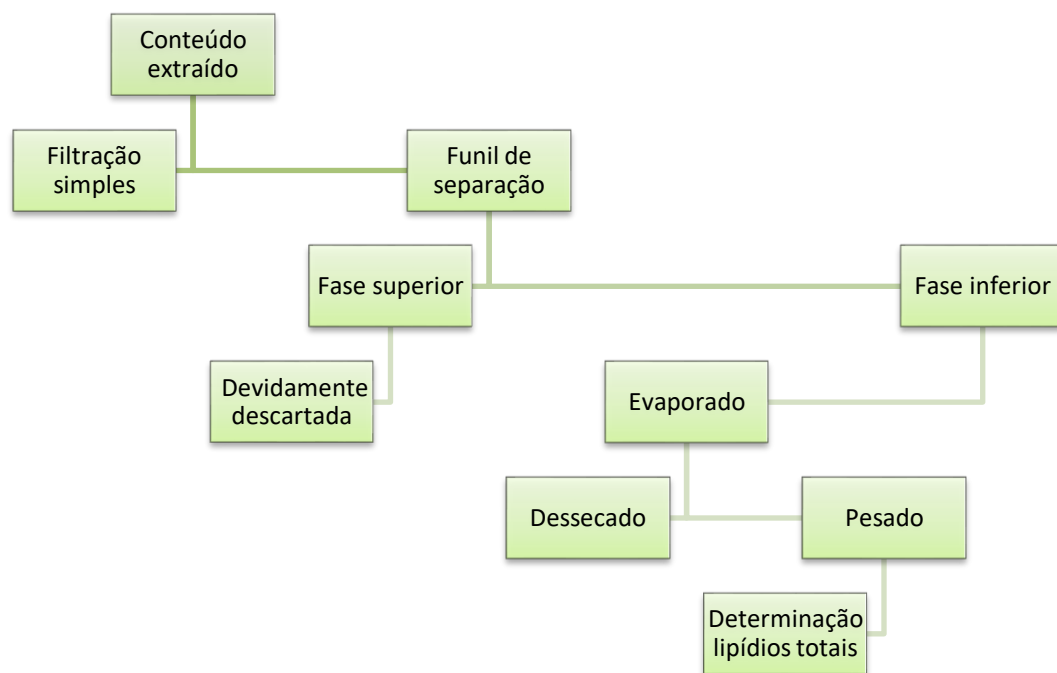


Figura 22 - Fluxograma procedimento de separação das fases dos métodos de Bligh and Dyer (1959) e Soxhlet.

Para calcular a porcentagem de lipídios em 1 g de biomassa seca utiliza-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{(m_2 - m_1)}{\text{Biomassa pesada (g)}} \cdot 100$$

Sendo m_2 a massa do frasco contendo os lipídios e m_1 a massa do frasco vazio.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO

4.5.1. Derivatização de óleos vegetais e gorduras

Cerca de 50 mg de amostra do óleo de microalga foram saponificados com 4 mL de solução metanólica de NaOH 2% sob agitação constante, em agitador magnético, e aquecimento por 5 minutos. Ainda sob agitação e aquecimento foram adicionados 6 mL de uma solução esterificante - preparada a partir de 8,29 g de cloreto de amônio (NH_4Cl), 250 mL de metanol e 13,6 mL de ácido sulfúrico concentrado – por mais 3 minutos. Ao termino do tempo adicionou-se 5 mL de bicarbonato de sódio e aguardou-se mais 2 minutos e por fim 5 mL de hexano e manteve agitação e aquecimento por mais 2 minutos, ao final do processo a fase solvente contendo os monoésteres foi coletada com pipeta Pasteur e avolumada com hexano num balão volumétrico de 100 mL e armazenada, para análise quantitativa em cromatografia gasosa e a fase aquosa foi descartada, o procedimento está descrito na Figura 23.

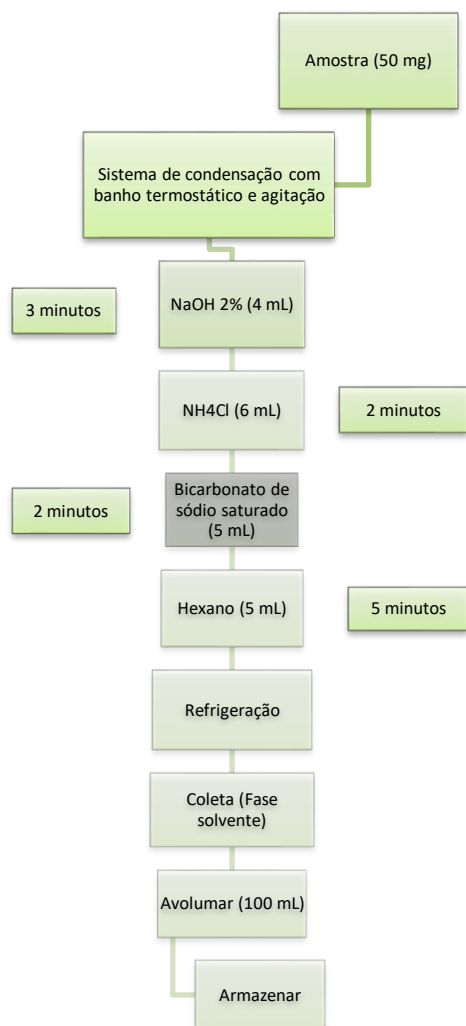


Figura 23 – Fluxograma do procedimento de derivatização de óleos e gorduras.

4.5.2. Análise cromatográfica

O perfil cromatográfico dos ácidos graxos foi realizado pelo CEPPA. As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo gasoso marca Varian® modelo CP3900 com injetor split/splitless com detector de ionização de chama (FID). A coluna capilar utilizada foi CpSil for FAME com recheio de Polietileno Glicol – 100 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,39 µm (espessura do filme). O gás de arraste utilizado foi N₂ mantido a um fluxo de 40 psi. O volume de injeção foi 1,0 µL. O forno foi programado para trabalhar no modo isotérmico a 210 °C e a temperatura do detector foi de 260 °C, sendo o tempo total da corrida de 70 min. Para detecção dos perfis de ácidos graxos nas amostras foi utilizado o Padrão de FAME da Sigma Supelco 37 componentes 10 mg.mL⁻¹. O software para aquisição de dados foi o Starwork Station 5.0. Os tempos de retenção dos ácidos graxos da amostra foram comparados com os tempos de retenção dos padrões, normalizados e os resultados expressos em g.100g⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2. CULTIVO DA MICROALGA EM MEIO ASM-1

5.2.1. Produtividade biomassa seca

A microalga *Scenedesmus sp.* foi cultivada em meio ASM-1 por um período de 15 dias, durante esse período foi monitorado o crescimento diário da biomassa seca, conforme procedimento descrito no item 4.3, a fim de definir o crescimento e delimitar um período ideal para os próximos cultivos realizados.

O crescimento da microalga é definido como um aumento da matéria viva, um dos métodos empregados para avaliação do crescimento das microalgas é a curva de crescimento. Esta pode ser expressa como sendo a relação entre o aumento da biomassa ou do número de células em um determinado volume pelo tempo. Em cada fase de crescimento, a microalga apresenta um metabolismo específico determinado pelas condições do ambiente. A Figura 24 apresenta o crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em termos de biomassa seca em g.L^{-1} .

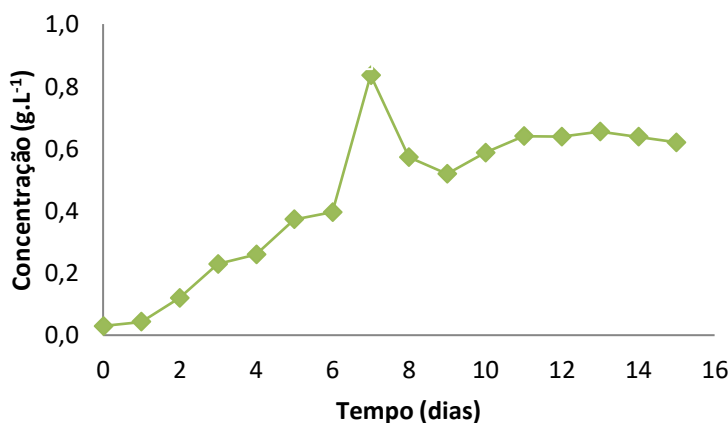


Figura 24 - Curva de crescimento da biomassa da *Scenedesmus sp.* cultivada em meio ASM-1.

Observa-se que a produtividade (g.L^{-1}) foi crescente, obtendo seu valor máximo de g.L^{-1} no 7º dia de cultivo, após isso houve um decaimento expressivo seguido de oscilações no crescimento da microalga.

5.3. DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE CULTIVO DAS MICROALGAS EM MEIO ASM-1 COM OTIMIZAÇÃO DE NITROGÊNIO

A Figura 25 apresenta o crescimento diário de biomassa seca (g.L^{-1}) calculada para todo o período de cultivo. O crescimento da microalga sofreu um aumento expressivo a partir do 3º dia e manteve-se aproximadamente constante até o 7º dia. O cultivo não foi interrompido no 7º dia, pois a quantidade de nutrientes no cultivo ainda era elevada e a microalga se encontra na fase de multiplicação celular, não armazenando lipídios nas células. Sendo assim, foi definido um período de cultivo de dez dias para todos os experimentos seguintes.

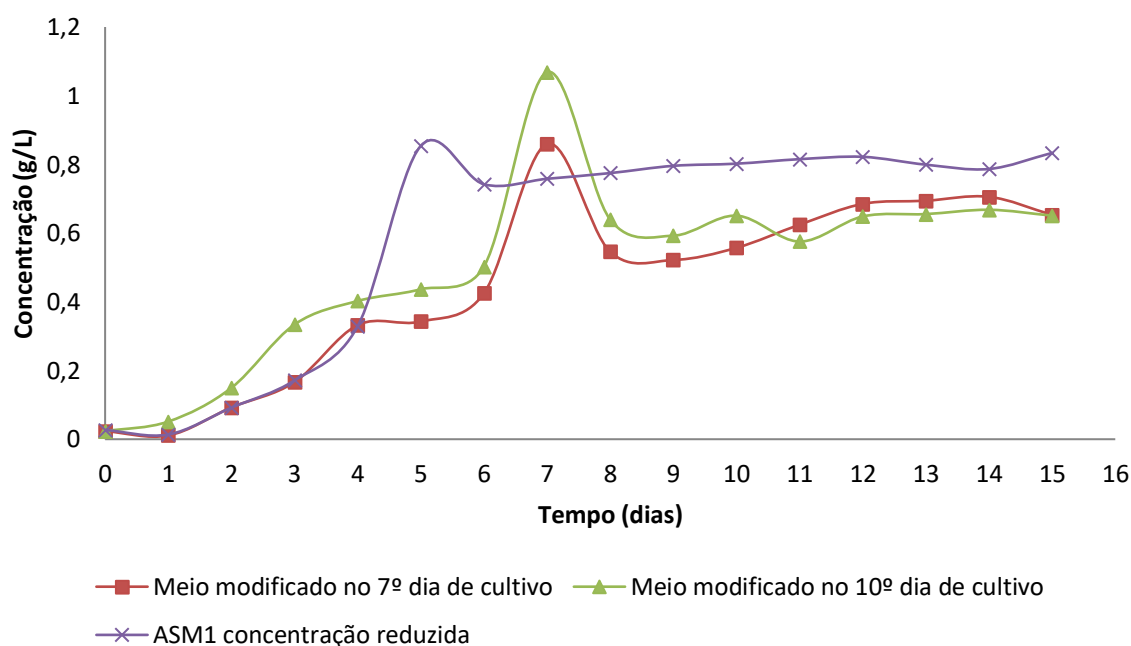


Figura 25 - Produtividade diária de biomassa seca em meio ASM-1

O primeiro experimento (Figura 25) teve a quantidade de nitrogênio reduzida à metade (ASM-1 modificado) sétimo dia de cultivo, o segundo experimento teve seu meio modificado quando o crescimento se manteve constante, no décimo primeiro dia, já o terceiro experimento foi conduzido durante os quinze dias com ASM-1 modificado, neste último verificou-se que a microalga atingiu seu crescimento mássico máximo no quinto dia de cultivo, dois dias a menos que

os experimentos conduzidos em um meio com mais nitrogênio, sendo assim um biorreator que além de reduzir custos com nutrientes tem também um menor gasto energético.

Os experimentos tiveram como objetivo determinar as melhores condições de crescimento e produção de biomassa para posterior extração de lipídios. As microalgas expostas a um meio ASM-1 modificado, com condição reduzida de nitrogênio, tiveram um crescimento mais expressivo em um tempo menor de cultivo, e manteve esse padrão durante toda a condução do experimento.

Meios de cultivo com diferentes composições são fornecidos às células na forma de CO₂, água e sais minerais. As mudanças da composição dos meios de cultivo têm sido adotadas a partir de resultados obtidos por meio de experimentos realizados sobre a necessidade ou a limitação por nutrientes. Identifica-se que os principais elementos limitantes são carbono, nitrogênio, fósforo e ferro.

Segundo Becker (1994) normalmente a produção de lipídios é inversamente proporcional à atividade fotossintética, que pode sofrer redução por diversos estresses. Sendo assim, a produção máxima de triacilgliceróis pode ser obtida através de 2 fases: 1) crescimento exponencial em condições ótimas seguido de; 2) imposição de algum tipo de estresse, como, por exemplo, limitação da disponibilidade de alguns nutrientes importantes, como o nitrogênio.

Recalcatti (2016) observou que, a supressão de nitrogênio influencia na produtividade de lipídeos, aumentando os teores destes na biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*., quando comparado ao teor lipídico da biomassa cultivada com nitrogênio, apresentando maiores rendimentos 7% com nitrogênio e 11% sem nitrogênio, independente da condição de cultivo.

Jarenkow (2014) em seu estudo se propôs a avaliar da influência do íon nitrato no cultivo de *Chlorella sp.*, focando o estudo na concentração de biomassa e no acúmulo de lipídeos. A concentração inicial menor de 300 mg L⁻¹ de NaNO₃ apresentou melhores resultados em relação à concentração final de biomassa (2,48 g L⁻¹) e acúmulo de lipídeos totais (12,0 % em peso seco).

5.4. DEFINIÇÃO DO PERÍODO DE CULTIVO DAS MICROALGAS EM MEIO ASM-1 COM OTIMIZAÇÃO DE LUZ E FÓSFORO

5.4.1. Otimização do meio de cultura sintético ASM-1

Buscando a melhor condição de fosfato, analisou-se a geração de biomassa seca produzida em cada uma das séries de experimento, bem como, ao tipo de sistema utilizado, os resultados podem ser conferidos na Figura 26.

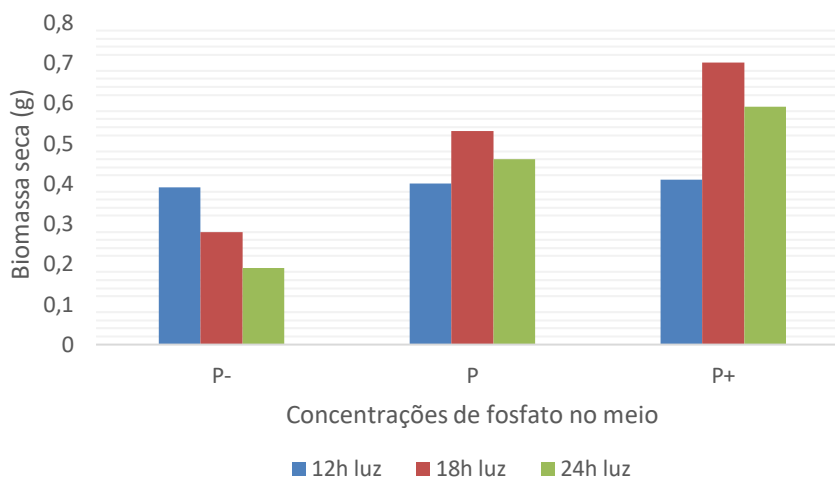


Figura 26 - Produção de biomassa seca ao final dos 10 dias de experimento.

Ao analisar a produtividade percebe-se a importância do fosfato na produção de biomassa da microalga e a influência da luz. Os experimentos com 18h de exposição a luz e maior concentração de fosfato produziram uma maior fração de biomassa ao final do processo.

Os meios com maiores níveis de fosfato (P+) e intermediário (P) obtiveram um rendimento de biomassa de duas a três vezes maior do que os experimentos com menor concentração de fosfato.

Ao usar um gráfico de superfície pode-se determinar os valores de resposta desejáveis e as condições de funcionamento. Através da Figura 27 é possível prever as condições de luz e fosfato que mais se aproximam do ponto ótimo de obtenção de biomassa da microalga *Scenedesmus* sp..

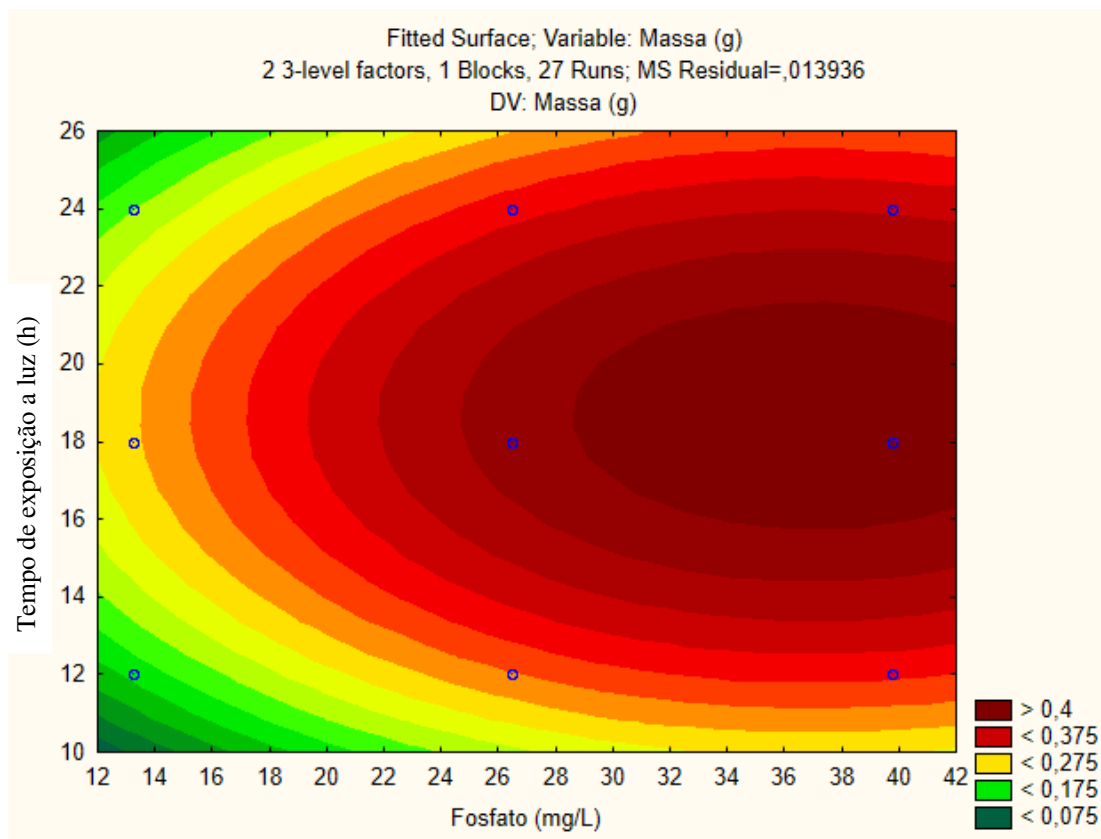


Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta em função da luz, fosfato e biomassa de microalga.

Nos gráficos de superfície quanto mais escura a região maior a proximidade com o ponto ótimo de operação, assim, analisando o gráfico, as concentrações de fosfato dentro do intervalo de 28 mg.L^{-1} e 40 mg.L^{-1} e uma exposição luminosa entre 16 e 22h são suficientes para que a microalga atinja maior produção de biomassa.

Kubelka et al. (2018) em seus estudos verificou que a concentração de nutrientes não diferiu significativamente entre os tipos de tratamentos utilizado. No entanto, as principais diferenças na produção de biomassa ocorreram quando a luz foi consideravelmente reduzida, indicando que a luz é um fator limitante de crescimento.

Fu et al. (2017) investigou a utilização de uma série de concentrações de fósforo de até 818% em meio BG11 para cultivar *Chlorella regularis* sob estresse por falta de nitrogênio durante o cultivo heterotrófico de glicose. O fósforo influenciou positivamente a síntese de microalgas e o conteúdo lipídico aumentou com o aumento dos níveis de fósforo fornecido. HAKALIN (2014)

em seu estudo com a *Scenedesmus sp.* mostrou que concentrações de fosfato abaixo de 50 mg.L^{-1} influenciam negativamente na geração de biomassa.

5.5. CULTIVO EM MANIPUEIRA

5.5.1. Cultivo em ASM-1 suplementado com manipueira

Nas diferentes concentrações de meio ASM-1 suplementado com manipueira a microalga não apresentou crescimento ao longo do tempo de cultivo. Nos experimentos com maior concentração de manipueira ela teve seu crescimento inibido por algum tipo de microrganismos mostrado na Figura 28, seu efetivo crescimento ocorreu nas diluições de 5% e 10%.



Figura 28 – Biorreator contendo manipueira em elevadas concentrações.

5.5.2. Produção de biomassa

Considerando que o cultivo com meio alternativo preparados com 10% de efluente da farinha (manipueira) apresentou comportamento semelhante quando comparados com meio

sintético (ASM-1), para confirmar foram realizados mais um grupo de experimentos com 10% e 5% de efluente.

A Figura 29 apresenta o crescimento de biomassa para os cultivos em meio sintético ASM-1, e efluente em 10% e 5%, durante 12 dias de cultivo.

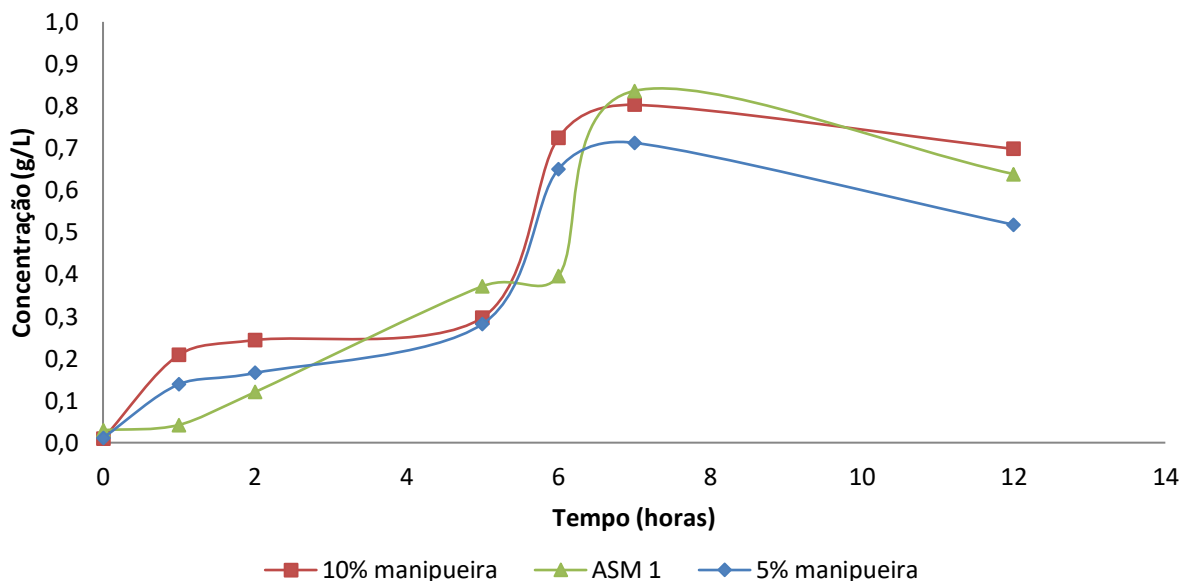


Figura 29 - Crescimento da microalga em concentração de biomassa seca 2º etapa de experimento com meio ASM-1 e manipueira com diluição 5% (a) e 10% (b).

Considerando a produtividade em biomassa obtida nesta segunda etapa de experimento, apesar do cultivo com efluente apresentar valores maiores de biomassa em relação ao ASM-1 na fase de pico do experimento, não apresentou uma diferença significativa no final do cultivo.

5.6. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS

Nesta etapa do experimento avaliou-se a influência do pré-tratamento na porcentagem de lipídios extraída da microalga utilizando-se a técnica de *Soxhlet*. A Figura 30 encontram-se as porcentagens de lipídios extraídas da microalga de duas diferentes formas a fim de avaliar a influência do pré-tratamento. A técnica de pré-tratamento térmico autoclave foi utilizada nessa etapa de extração.

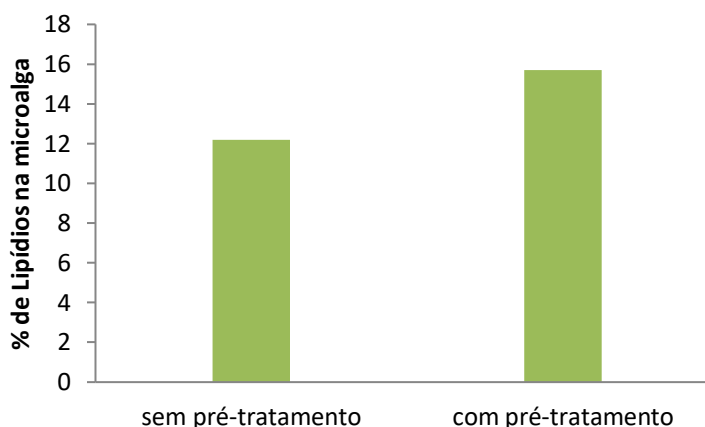


Figura 30 - Porcentagem de lipídios extraído da microalga com e sem o pré-tratamento pelo método de *Soxhlet*.

Utilizando a autoclave como um pré-tratamento e depois a extração pelo método de *Soxhlet*, houve um aumento de 4% na porcentagem de lipídios, quando comparado à extração sem o pré-tratamento. Olkiewicz et al. (2015) utilizaram a extração de lipídios por *Soxhlet* usando hexano. Para melhorar a eficiência da extração, investigou-se a influência dos métodos de pré-tratamento (desintegração ultrassônica e mecânica) e a duração desses tratamentos. Em seus estudos, os métodos de pré-tratamento não aumentaram significativamente a quantidade de lipídios extraídos, bem como o rendimento de produção do biodiesel. Onumaegbu et al. (2018) utilizou um pré-tratamento por microondas e o aumento do nível de produção de lipídios foi de 49%.

5.6.1. Comparação entre métodos de pré-tratamento para extração de lipídios da microalga

Após analisar a influência do pré-tratamento, buscou-se analisar alguns fatores que influenciam no processo de lise celular e extração através da microalga comparando dois métodos de extração (Bligh e Dyer adaptado e *Soxhlet*), dois sistemas de solventes (CE – Clorofórmio/etanol e CM – Clorofórmio/metanol) e dois tipos de pré-tratamentos (ultrassom e autoclave) para realizar a quebra da molécula.

O procedimento experimental para obtenção de lipídios foi realizado em duas etapas, os dados da primeira etapa, correspondente à extração baseada no método Bligh and Dyer (1959) com o uso do ultrassom e autoclave estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Dados da extração baseada no método Bligh & Dyer (1959) com o uso do ultrassom e autoclave

Sistema de solvent	Pré-tratamento	% de lipídio na microalga
CM*	Ultrassom (30 min)	10,78
(1:1)	Autoclave (15 min)	19,94
CE*	Ultrassom (30 min)	17,31
(1:1)	Autoclave (15 min)	19,27

CM*- Clorofórmio/Metanol

CE* - Clorofórmio/Etanol

Nota-se que para ambos os sistemas de solventes, os melhores resultados deram-se com a lise celular realizada com a autoclave. Esse resultado contraria os resultados obtidos por Lee et al. (2010), em que as porcentagens de lipídios obtidas foram de aproximadamente 5%, em biomassa seca, com a autoclave e dentre os dois tipos de pré-tratamento comparados no presente experimento, constata o ultrassom como o melhor para promover o rompimento da célula. A justificativa para essa divergência de resultados encontra-se no tempo de autoclave utilizado, visto que a metodologia por (Lee et al., 2010) utiliza apenas 5 minutos e nesse experimento adotou-se 15 minutos.

Segundo Andrade (2014) a porcentagem total de lipídio da *Scenedesmus sp.* corresponde a uma faixa de 19,6% a 21,1% em peso de biomassa seca, estando assim os estudos dentro da margem da literatura.

O melhor percentual de lipídio extraído da microalga *Scenedesmus sp.* foi obtido com o sistema CE. A justificativa para o melhor desempenho da extração utilizando o etanol deve-se à menor polaridade do etanol comparado à polaridade do metanol, fato observado através da menor constante dielétrica do etanol. Os lipídios costumam ser fracamente polares com constantes dielétricas na faixa de 2 a 4, portanto, solventes menos polares rendem maiores taxas de solubilização dos lipídios (Navarro López et al., 2016).

Para ambos os sistemas de solvente os melhores resultados deram-se com a lise celular realizada com a autoclave. Esse resultado contraria os resultados obtidos por Lee et al. (2010) em que as porcentagens de lipídios obtidas foram de aproximadamente 5%, em biomassa seca, com a autoclave e dentre os dois tipos de pré-tratamento comparados no presente experimento, constata o ultrassom como o melhor para promover o rompimento da célula. A justificativa para essa divergência de resultados pode ser por causa do tempo de autoclave utilizado, visto que a

metodologia por Lee et al. (2010) utiliza apenas 5 minutos e nesse experimento adotou-se 15 minutos.

5.6.2. Produção de lipídios

Ao final do cultivo foi analisada a produção de lipídios pelas microalgas. Para tanto, uma amostra de cada experimento foi coletada e a concentração de lipídio determinada por extração Bligh e Dyer (1959). Os resultados expressos na Figura 31 representam a porcentagem de lipídios dos experimentos independentes.

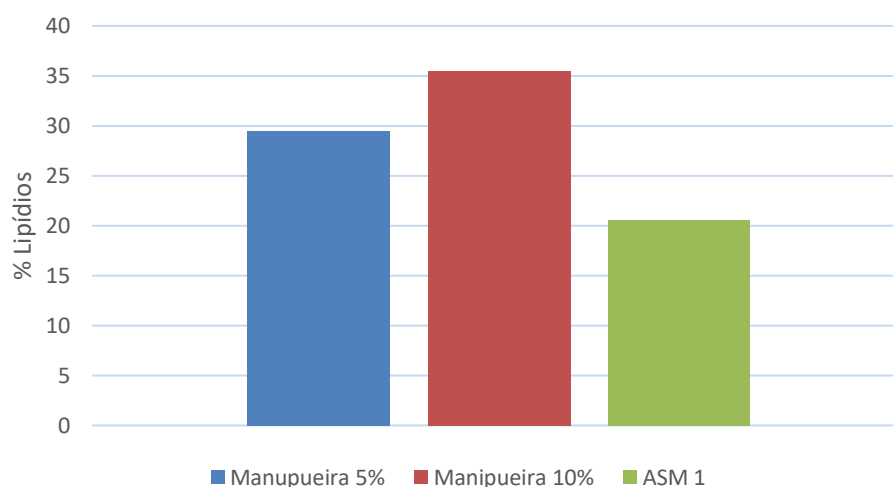


Figura 31- Porcentagem de lipídios totais na biomassa microalga cultivada em meio ASM-1 e em manipueira.

A partir da análise da Figura observa-se que a maior porcentagem de lipídios na biomassa microalgal cultivada com manipueira foi encontrada nos cultivos com 24h de exposição a luz, com destaque para o efluente com 10% de efluente (35,5% de lipídios). Todos os experimentos obtiveram porcentagem superior de lipídios ao cultivado em meio ASM-1, tal fato pode ser explicado pelo aumento de nutrientes presentes da adição de manipueira.

Como o meio ASM-1 da mistura com o efluente já foi um meio otimizado nas condições de fosforo e nitrogênio a microalga pode ter encontrado na manipueira as condições propicias para seu crescimento e produção de lipídios.

Shen et al. (2016) analisou os efeitos da deficiência de nitrogênio e diferentes níveis de oferta de fósforo na produção de biodiesel com a microalga *Chorella vulgaris*. A microalga obteve o maior teor de FAME (ácido graxo metil éster) (56%) de algas deficiente de nitrogênio. Curiosamente, a produtividade de ácidos graxos sob condições de falta de nitrogênio foi três vezes maior do que sob condições suficientes de nitrogênio. Além disso, a produtividade de FAME foi aumentada ainda mais quando a oferta de fosforo foi suficiente, não causando efeito causado a limitação de fósforo.

Quando se utiliza resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos, considera-se mais vantajoso o uso de altas concentrações devido o processo de biodegradação do resíduo que irá ocorrer durante o sistema que reduz o impacto ambiental do material ao ser lançado no ambiente. Contudo nem sempre o resíduo puro é um ambiente adequado para crescimento de microrganismos, fato que foi constatado com a microalga *Scenedesmus sp.*, a manipueira é um efluente líquido de cor amarelada e com uma elevada turbidez, que acaba produzindo o espalhamento de luz fruto da presença de partículas coloidais ou em suspensão, luz que é um fator limitante ao crescimento de microalgas.

5.7. PERFIL LIPÍDICO

A composição em ácidos graxos do material lipídico da espécie de microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em meio de cultura sintético (ASM-1) e suplementado com manipueira a 10% e 5% foi analisada por cromatografia a gás, os resultados estão expostos nas Figuras 32, 33 e 34.

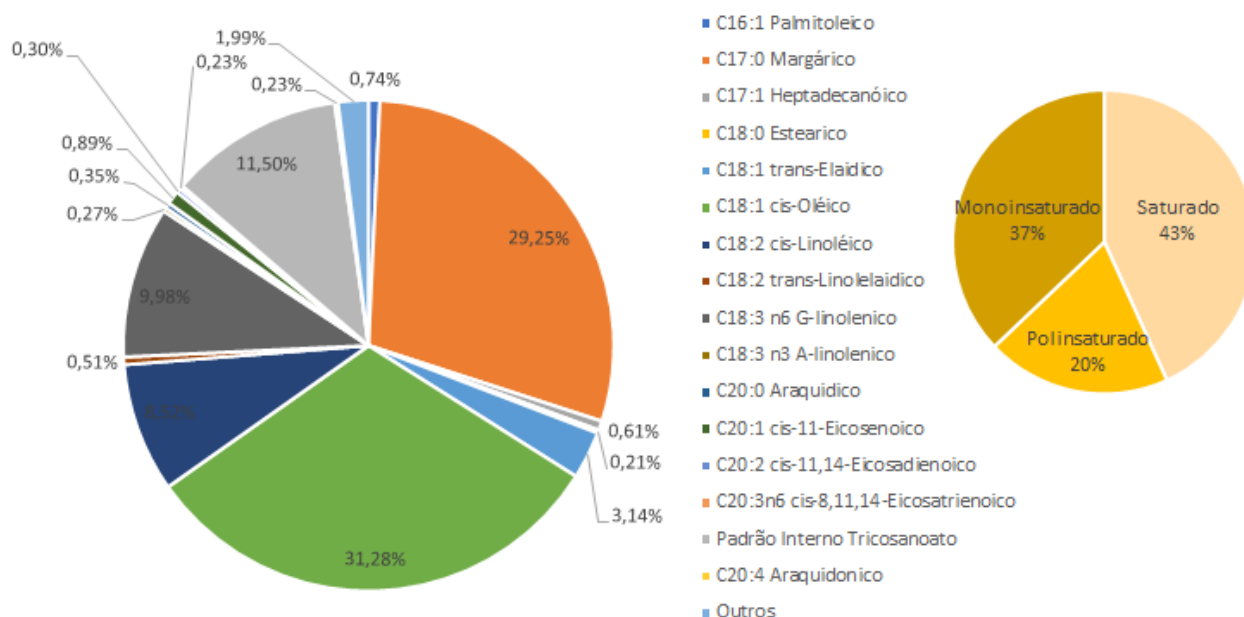


Figura 32 - Composição de ácidos graxos da biomassa da espécie estudada cultivada em meio ASM-1.

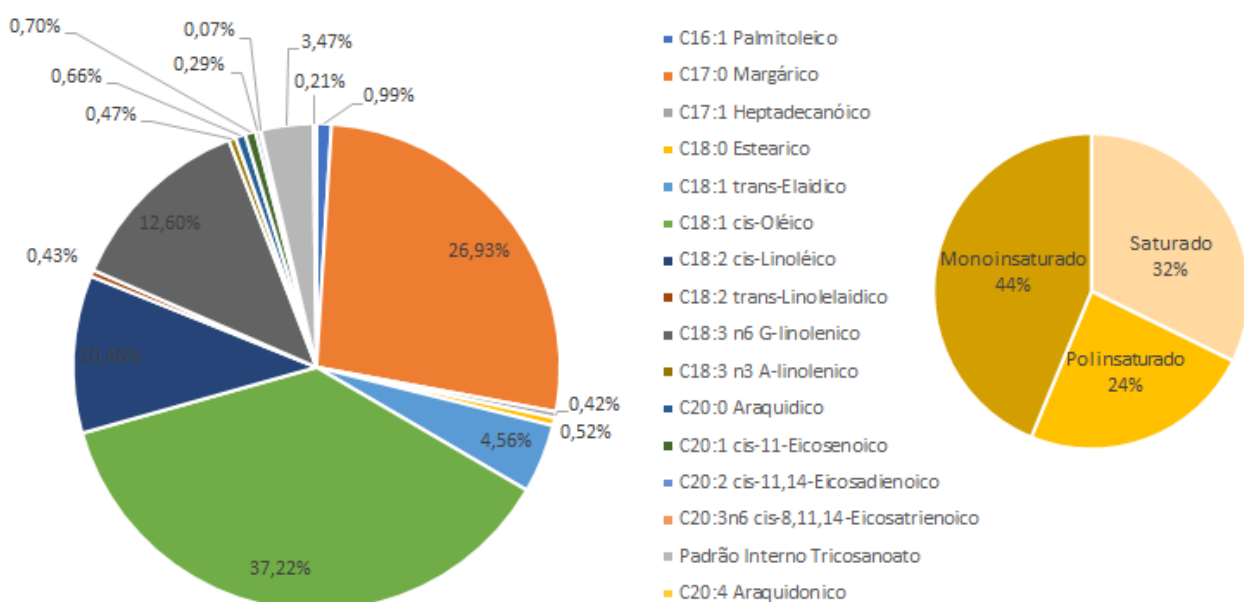


Figura 33 - Composição de ácidos graxos da biomassa da espécie estudada cultivada em meio suplementado com 5% de manipueira.

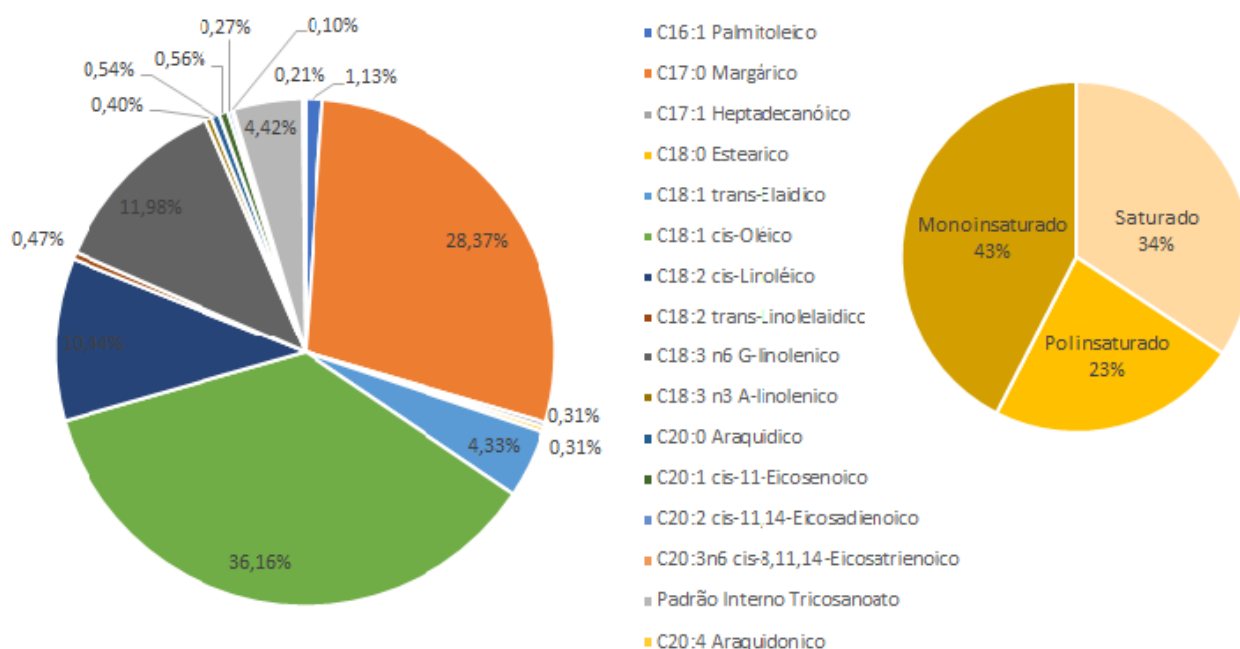


Figura 34 - Composição de ácidos graxos da biomassa da espécie estudada cultivada em meio suplementado com 10% de manipueira.

De acordo com os perfis organizados nas Figuras 32, 33 e 34, foram identificados 16 ácidos graxos com tamanho de cadeia variando entre C16 a C20, com diferentes graus de insaturação. De acordo com Pleissner et al. (2017) os ácidos graxos comumente encontrados em todas as microalgas são: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1 cis9), hexadecenóico (C16:1 cis11), hexadecadienóico (C16:2 cis7, cis10); heptadecenóico (C:17:1 cis9), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 cis9), vacênico (C18:1 cis11) e linolêico (C18:2 cis9, cis12). O perfil de ácidos graxos da *Scenedesmus* sp. é composto majoritariamente por ácidos graxos saturados e monoinsaturados, dentre os quais se destacam o ácido margárico (26% a 30%) e ácido oleico (31% a 38%), respectivamente. Com relação as formas de cultivo, a diferença significativa nos tipos de ácidos graxos produzido está essencialmente nos ácidos graxos saturados, que com a manipueira houve uma queda de 10% na produção desse tipo de ácido.

Além disso, observou-se nestas amostras considerável presença de ácidos graxos com três ou mais duplas ligações (19% a 24%). As insaturações reduzem a viscosidade do biodiesel e melhoram as propriedades de ponto de entupimento de filtro a filtro. Entretanto, a presença de ácidos graxos insaturados irá causar baixa estabilidade oxidativa ao biocombustível.

A Figura 35 ilustra a concentração dos grupos de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus sp.* nas três condições

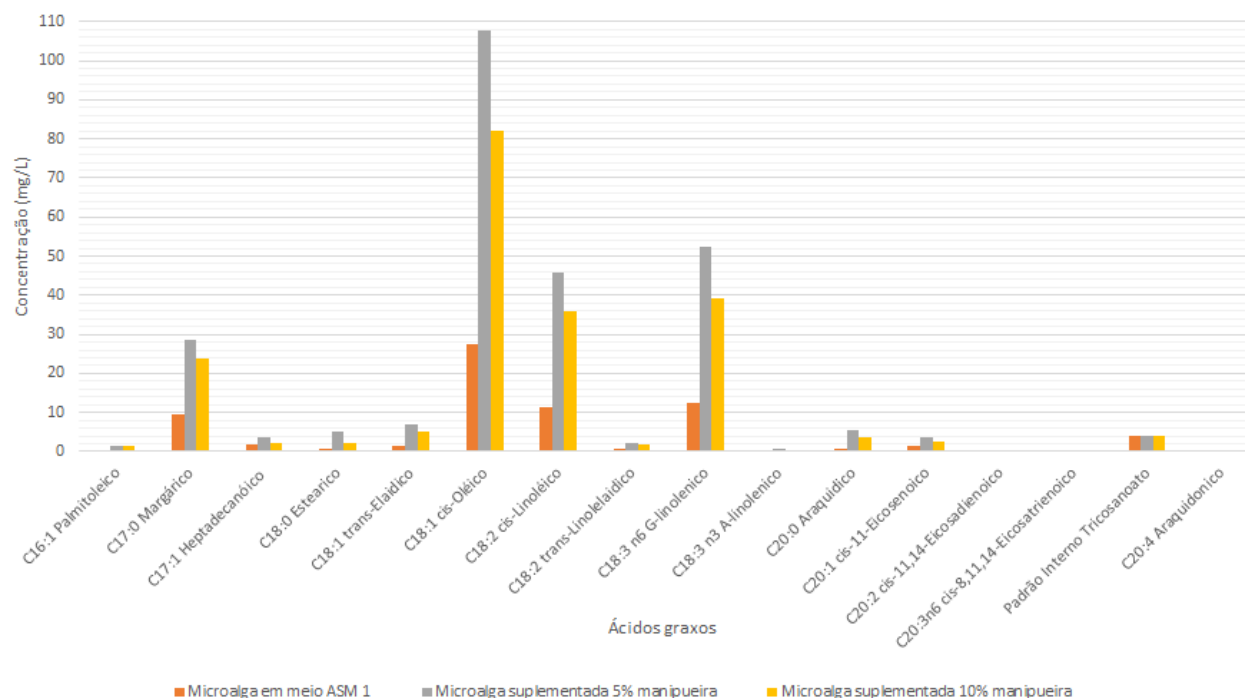


Figura 35 – Concentração dos ácidos graxos da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em meio sintético ASM-1 e em meio suplementado com 5% e 10% de manipueira.

Para que se tenha um biodiesel de alta qualidade é necessário altos teores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. A presença dos poliinsaturados não é desejável pois diminui a estabilidade oxidativa quando presente em grandes quantidades, devido à alta reatividade na presença de oxigênio, aumentando a viscosidade e causando corrosão. De maneira geral, os ácidos sintetizados em maior quantidade pela espécie independente da condição de cultivo foi o oleico (C18:1) do grupo dos monoinsaturados, linoleico e linolênico (C18:2 e C18:3) dos poliinsaturados e o margárico (C17:0) do grupo dos saturados.

A Tabela 25 mostra a composição de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em meio sintético ASM-1 e em meio suplementado com manipueira comparada com outras três matérias primas (soja, canola e palma) atualmente utilizadas para produção de biodiesel.

Tabela 25 – Perfil de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em meio sintético ASM-1 e em meio suplementado com manipueira a 5% e 10%

Ácido graxo	ASM-1	Manipueira 5%	Manipueira 10%	Soja	Algodão	Canola	Palma
C12:0	0	0	0	0	0	0	0,18
C14:0	0	0	0	0,06	1,5	0,06	0,71
C15:1	0	0	0	9	0	0	0
C16:0	0	0	0	9,9	25	3,75	41,86
C16:1	0,74	0,99	1,13	0,08	0	0,21	0,14
C17:0	29,25	26,93	28,37	0,1	0	0,04	0,09
C17:1	0,61	0,42	0,31	0,08	0	0	0
C18:0	0,21	0,52	0,31	3,94	1,72	1,87	4,86
C18:1	39,8	41,78	40,49	21,35	28	62,41	42,09
C18:2	9,03	10,89	10,91	56,02	40	20,12	8,67
C18:3	10,25	13,07	12,38	7,15	0,5	8,37	0,22
C20:0	0,35	0,66	0,54	0,41	0	0,64	0,37
C20:1	0,89	0,7	0,56	0	0	1,54	0,16
C20:2	0,3	0,29	0,27	0	0	0,11	0
C20:3	0,23	0,07	0,1	0	0	0	0
C20:4	0,23	0,21	0,21	0	0	0	0
C22:0	0	0	0	0	0	0,35	0,06
C23:0	11,5	3,47	4,42	0	0	0	0
C24:0	0	0	0	0	0	0,27	0,08
C24:1	0	0	0	0	0	0,26	0
Ác. graxo Saturado	42,38	32,28	34,26	14,41	28,22	6,98	48,21
Ác. graxo Monoinsaturado	36,35	43,76	42,45	21,51	28	64,42	42,39
Ác. graxo Poli-insaturado	19,28	23,96	23,29	63,17	40,5	28,6	8,89
Teor de insaturação	1,31	2,10	1,92	5,88	2,43	13,33	1,06
FONTE	Autor	Autor	Autor	Zambiasi et al. (2007)	Dantas (2006)	Zambiasi et al. (2007)	Corsini et al. (2008)

Observa-se que os resultados encontrados para os ácidos graxos saturados das microalgas *Scenedesmus sp.* são semelhantes aos resultados encontrados para o óleo de palma, muito utilizado na culinária. Para ácidos graxos poli-insaturados a microalga apresentou valores menores que o óleo de soja, algodão e canola, utilizados para produção de biocombustíveis. Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de utilizar o óleo da microalga para produção do biodiesel devido ao baixo teor de insaturação, menor que o de óleos vegetais (soja, algodão e canela). Segundo Kumar (2017), para o óleo ser de boa qualidade, deve ter pouco ácido graxo poli-insaturado na sua estrutura, pois esses ácidos

causam instabilidade oxidativa, necessitando de antioxidantes, a utilização desses antioxidantes eleva o custo do biodiesel.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a densidade celular, condições de cultivo, biomassa seca e conteúdo lipídico da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio sintético ASM-1, e em meio de cultivo alternativo proveniente do complemento com manipueira, resíduo das casas de farinha da região, a fim de definir a concentração de efluente propicia para o crescimento da microalga em termos de biomassa e lipídios totais. Desta forma a *Scenedesmus* sp. obteve sua maior concentração celular ($1,3 \text{ g.L}^{-1}$) e máximo teor lipídico (18,28 %) empregando-se 18h de exposição a luz, $39,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de fosfatos, 85 mg.L^{-1} de nitrato no sétimo dia de cultivo.

Os experimentos mostraram que a combinação de pré-tratamentos realizados na biomassa microalgal e por conseguinte a utilização dos sistemas de solventes empregados neste trabalho, facilitaram a extração dos lipídios da *Scenedesmus* sp.. Em relação aos métodos de extração, o Bligh and Dyer (1959) adaptado com o uso de ultrassom e sistemas de solventes clorofórmio/etanol obteve maior rendimento (19,27%) e baixo custo com energia térmica, quando comparado ao Soxhlet testado, também, com mesmo o sistema de solvente que resultou em 15,71% de lipídeo totais extraídos. Nessas condições otimizadas a maior produtividade de lipídios na biomassa de microalgas cultivada em meio suplementado com manipueira a 10% foi de 35,5%. Os meios de cultivos formulados a partir da manipueira (5% - 10%) apresentaram melhor eficiência na produção de biomassa seca de microalgas em comparação ao meio de cultivo sintético. A análise do perfil lipídico permite afirmar que o uso da manipueira como suplemento do meio sintético não afeta a qualidade dos ácidos graxos encontrados já que em sua maior parte são compostos por ácidos graxos saturados e monoinsaturados (76% a 79%), compostos que garantem a boa qualidade do biodiesel. Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de utilizar o óleo da microalga para produção do biodiesel devido ao baixo teor de insaturação, menor que o de óleos vegetais (soja, algodão e canela).

Como recomendações para trabalhos futuros: realizar o *scale up* do crescimento das microalgas em manipueira para obtenção de maiores quantidade de lipídios e posterior reação de transesterificação para obtenção de biodiesel; analisar as características do biodiesel produzido; investigar outros efluentes agroindustriais como fonte de nutrientes para cultivo de microalgas em fotobiorreatores, avaliando a eficiência de biorremediação pela remoção dos nutrientes presentes;

Determinar os teores de produtos de alto valor agregado presentes na biomassa de microalgas como a clorofila, luteína, ácidos graxos poliinsaturados, carboidratos e proteínas; avaliar a depuração provocada pelo cultivo de microalgas nos resíduos para parâmetros físico-químicos não avaliados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AARONSON, S., BERNER, T. & DUBINSKY, Z. 1980. *Microalgae as a source of chemicals and natural products. Algae biomass: production and use*/[sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft fur Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder.
- ABRANTES, L. C. L. 2013. *Acompanhamento de construção de habitação nova no Brasil: implementação e certificação segundo a ISO 9001: 2008.*
- AEENEHVAND, S., TOUDEHROUSTA, Z., KAMANKESH, M., MASHAYEKH, M., TAVAKOLI, H. R. & MOHAMMADI, A. 2016. Evaluation and application of microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of polar heterocyclic aromatic amines in hamburger patties. *Food chemistry*, 190, 429-435.
- AGUZZI, A. & ALTMAYER, M. 2016. Phase separation: linking cellular compartmentalization to disease. *Trends in cell biology*, 26, 547-558.
- AK, İ. 2012. Effect of an organic fertilizer on growth of blue-green alga *Spirulina platensis*. *Aquaculture international*, 20, 413-422.
- ALMEIDA, L. M. R., DE SOUZA, C. O., RIBEIRO, P. L. L., DRUZIAN, J. I. & MIRANDA, M. S. 2017. ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE PRODUTOS ALIMENTARES INCORPORADOS DE BIOMASSA DE MICROALGAS. *Cadernos de Prospecção*, 10, 893.
- ALTOMONTE, I., SALARI, F., LICITRA, R. & MARTINI, M. 2018. Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality—A Review. *Livestock Science*.
- ALVES, A. F. 2016. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E CAROTENOIDES DA MICROALGA HETEROCHLORELLA LUTEOVIRIDIS VIA ULTRASSOM.
- ANDRADE, D., COLOZZI-FILHO, A., GUEDES, C., LIMA, F., MACHINESKI, G. & MATOS, M. 2014. Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas. *Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios do cultivo*. Londrina: IAPAR, 265-343.
- ANDRADE, L. M. D. 2014. Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas. Universidade de São Paulo.
- ANDRADE, M. D. R. & COSTA, J. A. V. 2008. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. *Ciência e agrotecnologia*, 32, 1551-1556.
- ANELE, U., YANG, W., MCGINN, P., TIBBETTS, S. & MCALLISTER, T. 2016. Ruminal in vitro gas production, dry matter digestibility, methane abatement potential, and fatty acid biohydrogenation of six species of microalgae. *Canadian Journal of Animal Science*, 96, 354-363.
- ANSARI, F. A., GUPTA, S. K., NASR, M., RAWAT, I. & BUX, F. 2018. Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. *Journal of Cleaner Production*, 182, 634-643.
- ANYANWU, R. C., RODRIGUEZ, C., DURRANT, A. & OLABI, A. G. 2018. *Microalgae Cultivation Technologies. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier.
- APT, K. E. & BEHRENS, P. W. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of phycology*, 35, 215-226.
- ARAÚJO, F., DA PAZ, G., DE OLIVEIRA, Y. & LEITE, C. 2012. Estudo da viabilidade de microalgas para produção de biodiesel. VII CONEPI. Piauí.
- ARAÚJO, H. B. 2016. Potencialidades do uso da manipueira na agricultura.
- ARCEO, Á. A., ARANDA, D. A. & DÍAZ, R. T. A. 2012. Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. Tese de Doutorado. 204 p. Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ.

- ARENAS, E., RODRIGUEZ PALACIO, M., JUANTORENA, A., FERNANDO, S. & SEBASTIAN, P. 2017. Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges. *International Journal of Energy Research*, 41, 761-789.
- ASOMANING, J., HAUPT, S., CHAE, M. & BRESSLER, D. C. 2018. Recent developments in microwave-assisted thermal conversion of biomass for fuels and chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 642-657.
- BAJGUZ, A. 2019. *Brassinosteroids in Microalgae: Application for Growth Improvement and Protection Against Abiotic Stresses*. *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*. Springer.
- BARCELLOS, F. C., DE OLIVEIRA, J. C. & DE CARVALHO, P. G. M. 2009. Investimento ambiental em indústrias sujas e intensivas em recursos naturais e energia. *Revibec: revista iberoamericana de economía ecológica*, 12, 33-50.
- BATISTA, A. P., GOUVEIA, L., BANDARRA, N. M., FRANCO, J. M. & RAYMUNDO, A. 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2, 164-173.
- BECKER, E. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25, 207-210.
- BECKER, E. W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press.
- BEHRENS, P. W. & KYLE, D. J. 1996. Microalgae as a source of fatty acids. *Journal of Food Lipids*, 3, 259-272.
- BELAY, A., OTA, Y., MIYAKAWA, K. & SHIMAMATSU, H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of applied Phycology*, 5, 235-241.
- BERNDMEYER, C., THIEL, V. & BLUMENBERG, M. 2014. Test of microwave, ultrasound and Bligh & Dyer extraction for quantitative extraction of bacteriohopanepolyols (BHPs) from marine sediments. *Organic Geochemistry*, 68, 90-94.
- BHALAMURUGAN, G. L., VALERIE, O. & MARK, L. 2018. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, 23, 229-241.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37, 911-917.
- BONINI, M. D. A. 2016. Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*: aspectos toxicológicos e microbiológicos.
- BRESOLIN, L., RANZAN, C., RAMIREZ, N. N. V., TRIERWEILER, L. F., FARENZENA, M. & TRIERWEILER, J. O. 2018. Estudo da Quantificação de Lipídios Microalgais Através de Fluorescência 2D. Trabalho apresentado em Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química.
- BRUM, A. A. S. & ARRUDA, L. F. D. 2009. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32, 849-854.
- BUNDHOO, Z. M. 2018. Microwave-assisted conversion of biomass and waste materials to biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1149-1177.
- CARDOSO, A. D. S., VIEIRA, G. E. G. & MARQUES, A. K. 2011. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. *Revista Brasileira de Biociências*, 9.
- CASSURIAGA, A., MORAIS, E., FREITAS¹, B. & COSTA, J. 2015. CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM FOTOBIOREATOR TUBULAR HORIZONTAL PARA BIOFIXAÇÃO DE CO₂. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1, 763-770.
- CESÁRIO, M., DA FONSECA, M., MARQUES, M. & DE ALMEIDA, M. 2018. Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology advances*.
- CHAUMONT, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5, 593-604.

- CHEW, K. W., CHIA, S. R., SHOW, P. L., YAP, Y. J., LING, T. C. & CHANG, J.-S. 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332-344.
- CHEW, K. W., YAP, J. Y., SHOW, P. L., SUAN, N. H., JUAN, J. C., LING, T. C., LEE, D.-J. & CHANG, J.-S. 2017. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology*, 229, 53-62.
- CHISTÉ, R. C., COHEN, K. D. O., MATHIAS, E. D. A. & OLIVEIRA, S. S. 2010. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. *Acta Amazonica*.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae *Biotechnology Advances* 25: 294–306. Google Scholar.
- CIFERRI, O. & TIBONI, O. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual review of microbiology*, 39, 503-526.
- COHEN, Z. 2014. *Chemicals from microalgae*, CRC Press.
- CORSINI, M. D. S., JORGE, N., MIGUEL, A. M. R. D. O. & VICENTE, E. 2008. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. *Química Nova*, 956-961.
- COSTA, D. A. D. N. 2016. Estudo do processo de extração do óleo da Macaúba (*Acrocomia Intumescens*).
- COSTA, J. 2018. Potencial uso da manipueira no controle larvicida do *Aedes aegypti*.
- CRUZ, R. M. M. D. 2017. Avaliação da extração e recuperação de betumes modificados com polímeros em misturas betuminosas.
- DA SILVA, C. & SILVA, S. B. 2016. Avaliação de solventes e condições experimentais para extração do óleo de sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.). *Engvista*, 18, 348-362.
- DA SILVA CARDOSO, A., VIEIRA, G. E. G. & MARQUES, A. K. 2011. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. *Revista Brasileira de Biociências*, 9, 542.
- DA SILVA, G., DE JESUS, E. F., TAKIYA, C., DEL VALLE, T., DA SILVA, T., VENDRAMINI, T., ESTHER, J. Y. & RENNÓ, F. 2016. Partial replacement of ground corn with algae meal in a dairy cow diet: Milk yield and composition, nutrient digestibility, and metabolic profile. *Journal of dairy science*, 99, 8880-8884.
- DA SILVA, T. L., GOUVEIA, L. & REIS, A. 2014. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 1043-1053.
- DANTAS, H. J. 2006. Estudo Termoanalítico, Cinético e Reológico de biodiesel derivado do óleo de algodão (*Gossypium Hisutum*). João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado.
- DE ALMEIDA LOPES, T. S., DA SILVA, A. L. A., SILVA, A. F., DANTAS, G. D. & FERREIRA, W. B. 2015. Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella* sp. *Revista Ciência e Tecnologia*, 18.
- DE AZEREDO, V. B. S. 2012. Produção de Biodiesel a partir do Cultivo de Microalgas: Estimativa de Custos e Perspectivas para o Brasil. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
- DE CASTRO, M. L. & GARCIA-AYUSO, L. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369, 1-10.
- DE JESUS, S. S., FERREIRA, G. F., FREGOLANTE, L. V. & MACIEL FILHO, R. 2018. Laboratory extraction of microalgal lipids using sugarcane bagasse derived green solvents. *Algal research*, 35, 292-300.
- DE MEDEIROS JERONIMO, C. E., SILVA, R. M. D. & BACHOLSKY, R. G. 2015. Produção de Biodiesel por Algas: Integração com Processos de Carcinicultura. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 19, 713-724.
- DE OLIVEIRA, I. R., DE LEMOS CARVALHO, H. W., DE CARVALHO, L. M. & DE OLIVEIRA, M. F. 2018. Validação de tecnologias para a elevação da produtividade da mandioca em Sergipe. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.

- DEBONI, T. M. 2017. Desacidificação e produção de biodiesel no processamento de óleo de soja utilizando resina aniônica.
- DREW, S. & FLICKINGER, M. 1999. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation Biocatalysis and Bioseparation*.
- EMBRAPA 2017. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Mandioca em números* In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. (ed.).
- FAO 2016. *Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura: Produção Mundial de Raiz de Mandioca*. In: SOCIAL, D. E. E. (ed.).
- FARIED, M., SAMER, M., ABDELSALAM, E., YOUSEF, R., ATTIA, Y. & ALI, A. 2017. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 893-913.
- FAZAL, T., MUSHTAQ, A., REHMAN, F., KHAN, A. U., RASHID, N., FAROOQ, W., REHMAN, M. S. U. & XU, J. 2018. Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3107-3126.
- FERNANDES, I. S. 2017. Produção de biossurfactante por *paenibacillus* sp utilizando como meio de cultura a manipueira.
- FERNANDES, J. C. B. 2016. Função de desejabilidade na qualidade de biodiesel a partir das misturas de biodieseis de mamona e amendoim.
- FERNANDES, M. S. M., FRANÇA, K. B., ALVES, R. V., PEARSON, H. W., LIMA, S. A., COSTA, T. S. & GUIMARÃES, B. D. S. 2017. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *SCENEDESMUS* SP. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl. *Engvista*, 19, 185-193.
- FISHWICK, M. J. & WRIGHT, A. J. 1977. Comparison of methods for the extraction of plant lipids. *Phytochemistry*, 16, 1507-1510.
- FLORES, C. C., PEÑA-CASTRO, J. M., FLORES-COTERA, L. B. & CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28, 450-456.
- FOLCH, J., ASCOLI, I., LEES, M., MEATH, J. & LEBARON, F. 1951. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. biol. Chem*, 191, 833-841.
- FONTES, A. G., VARGAS, M. A., MORENO, J., GUERRERO, M. G. & LOSADA, M. 1987. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass*, 13, 33-43.
- FRANCO, A. L. C., LÔBO, I. P., CRUZ, R. S., TEIXEIRA, C., NETO, J. A. D. A. & MENEZES, R. S. 2013. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova*, 36, 437-448.
- FU, L., CUI, X., LI, Y., XU, L., ZHANG, C., XIONG, R., ZHOU, D. & CRITTENDEN, J. C. 2017. Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chemical Engineering Journal*, 330, 566-572.
- GALVÃO, A. C., COPETTI, M., DAL MAGRO, C., ILTCHENCO, S. & ROBAZZA, W. S. 2013. Extração do óleo da polpa do abacate com Metanol e Etanol a diferentes temperaturas. *Ciência e Natura*, 35, 304-310.
- GARCIA, C. A. B., ANDRADE, A. C. S., DE MENEZES, A. L., ANDRADE, T. J. & GARCIA, H. L. Caracterização química do efluente do processamento de mandioca em Sergipe. *Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress*, 2014. 62-65.
- GORHAM, P., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. & KIM, W. 1964. ISOLATION AND CULTURE OF TOXIC STRAINS OF *ANABAENA FLOS-AQUAE*(LYNGB.) DE BREB.
- GOUVEIA, L., NOBRE, B., MARCELO, F., MREJEN, S., CARDOSO, M., PALAVRA, A. & MENDES, R. 2007. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry*, 101, 717-723.
- GRAZIANI, G., SCHIAVO, S., NICOLAI, M. A., BUONO, S., FOGLIANO, V., PINTO, G. & POLLIO, A. 2013. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & function*, 4, 144-152.

- GREEN, D. W. 2008. *Perry's chemical engineers'*, McGraw Hill.
- GREENLY, J. M. & TESTER, J. W. 2015. Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 276-279.
- GRIS, L. R. S. 2014. Recuperação de *Scenedesmus* sp. por floculação e flotação por ar dissolvido.
- GRÖGER, H. 2016. *Practical and Engineering Aspects of Running Enzyme Reactions. Organic Synthesis Using Biocatalysis*. Elsevier.
- GUNNLAUGSDOTTIR, H. & ACKMAN, R. G. 1993. Three extraction methods for determination of lipids in fish meal: Evaluation of a hexane/isopropanol method as an alternative to chloroform-based methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 235-240.
- HAKALIN, N. L. S. 2014. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel.
- HARA, A. & RADIN, N. S. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical biochemistry*, 90, 420-426.
- HERNANDEZ, J.-P., DE-BASHAN, L. E. & BASHAN, Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 190-198.
- HIDALGO, P., CIUDAD, G. & NAVIA, R. 2016. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 201, 360-364.
- HO, S.-H., CHEN, C.-Y. & CHANG, J.-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.
- HOSSAIN, A. S., SALLEH, A., BOYCE, A. N., CHOWDHURY, P. & NAQUIDDIN, M. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American journal of biochemistry and biotechnology*, 4, 250-254.
- IKARAN, Z., SUÁREZ-ALVAREZ, S., URRETA, I. & CASTAÑÓN, S. 2015. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research*, 10, 134-144.
- IVERSON, S. J., LANG, S. L. & COOPER, M. H. 2001. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36, 1283-1287.
- JACINAVICIUS, F. R., GAMA JUNIOR, W., AZEVEDO, M. & SANTANNA, C. 2013. *Manual para cultivo de cianobactérias*. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente.
- JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q. & QUEIROZ, M. I. 2018. *Energy from Microalgae*, Springer.
- JARENKOW, A. 2014. Estudo da produção e extração de lipídeos na microalga *Chlorella* sp.
- KADIR, W. N. A., LAM, M. K., UEMURA, Y., LIM, J. W. & LEE, K. T. 2018. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: a review. *Energy conversion and management*, 171, 1416-1429.
- KATES, M. 1986. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, 3, 123-127.
- KHANAL, S. K., GREWELL, D., SUNG, S. & VAN LEEUWEN, J. 2007. Ultrasound applications in wastewater sludge pretreatment: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 277-313.
- KIM, S.-K. 2015. *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*, Academic Press.
- KUBELKA, B. G., ROSELET, F., PINTO, W. T. & ABREU, P. C. 2018. The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in massive culture systems. *Algal Research*, 35, 569-576.
- KULPYS, J., PAULAUSKAS, E., PILIPAVICIUS, V. & STANKEVICIUS, R. 2009. Influence of cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* biomass additive towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agron. Res*, 7, 823-835.

- KUMAR, N. 2017. Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel*, 190, 328-350.
- KURD, F. & SAMAVATI, V. 2015. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *International journal of biological macromolecules*, 74, 498-506.
- LEE, A. K., LEWIS, D. M. & ASHMAN, P. J. 2015. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. *Journal of applied phycology*, 27, 1881-1889.
- LEE, J.-Y., YOO, C., JUN, S.-Y., AHN, C.-Y. & OH, H.-M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, S75-S77.
- 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, 553-556.
- LEE, S. Y., CHO, J. M., CHANG, Y. K. & OH, Y.-K. 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317-1328.
- LEITÃO, A. L. O. D. S. 2017. Avaliação de métodos de rompimento celular e de diferentes metais imobilizados em resina Streamline Chelating para purificação do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*. Brasil.
- LEONG, W.-H., LIM, J.-W., LAM, M.-K., UEMURA, Y. & HO, Y.-C. 2018. Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 950-961.
- LEWANDOSKI, C. F., DE LIMA BUENO, P., LEITE, D., GRALICK, J., SANTOS, R. F., DA SILVEIRA, L. & BRESSAN, R. T. Biodiesel de óleo cru refinado e de óleo fritura de girassol. *Acta Iguazu*, 5, 39-46.
- LI, T., XU, J., GAO, B., XIANG, W., LI, A. & ZHANG, C. 2016. Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiphyceae) under low and high nitrogen supplies. *Algal Research*, 16, 481-491.
- LIAO, Q., SUN, Y., HUANG, Y., XIA, A., FU, Q. & ZHU, X. 2017. Simultaneous enhancement of *Chlorella vulgaris* growth and lipid accumulation through the synergy effect between light and nitrate in a planar waveguide flat-plate photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243, 528-538.
- LIMA, M. D. M. 2016. Avaliação do ciclo de vida da produção de biomassa de microalgas em meio efluente.
- LÔBO, I. P., FERREIRA, S. L. C. & CRUZ, R. S. D. 2009. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos.
- LUO, L., HE, H., YANG, C., WEN, S., ZENG, G., WU, M., ZHOU, Z. & LOU, W. 2016. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology*, 216, 135-141.
- MACIEL, M. J., DA SILVA, M. M. A. S., ETHUR, E. & AVANCIN, C. A. M. 2017. Indicadores fitoquímicos e atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* ("macela") frente *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em produtos de origem animal (suínos e aves). *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 11, 273-288.
- MADEIRA, M. S., CARDOSO, C., LOPES, P. A., COELHO, D., AFONSO, C., BANDARRA, N. M. & PRATES, J. A. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, 205, 111-121.
- MAGALHÃES, A. G., ROLIM, M. M., DUARTE, A. D. S., NETO, E. B., TABOSA, J. N. & PEDROSA, E. M. 2014. Desenvolvimento inicial do milho submetido à adubação com manipueira. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, 18.
- MARQUES, M. C. 2009. Atributos do solo, qualidade do lixiviado e crescimento de plantas de milho sob aplicação de água residuária da mandioca.
- MARTINS, A. F. S. 2016. Implementação e validação de métodos analíticos.
- MARTINS, F. C., FRANCO, D. L., MUÑOZ, R. A. & SOUZA, D. D. 2017. ORGANIC AND INORGANIC COMPOUNDS CONTAINING SELENIUM: ANALYTICAL METHODS REVIEW AND CHEMICAL ANALYSIS PERSPECTIVES. *Química Nova*, 40, 1204-1214.

- MARX, G., MOODY, A. & BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. 2011. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 327-337.
- MAYER, J. G. 2018. Comparação da análise de ácidos graxos TRANS em biscoito por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (cg-em) e por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier e reflectância total atenuada (FT-IR-ATR).
- MIRANDA, M. D. P. S. 1997. Antioxidantes naturais em microalgas cultivadas em condições especiais: avaliação química e biologia.
- MORAES, G. S. C. 2018. Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir da microalga *Chlorella Vulgaris*.
- MORIOKA, L. R. I., MATOS, Â. P., OLIVO, G. & SANT'ANNA, E. S. 2014. Floculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. *Química Nova*, 37, 44-49.
- MOTA, L. M. H. D., CRUZ, B. A., BRENOL, C. V., PEREIRA, I. A., REZENDE-FRONZA, L. S., BERTOLO, M. B., FREITAS, M. V. C. D., SILVA, N. A. D., LOUZADA-JÚNIOR, P. & GIORGI, R. D. N. 2012. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Revista brasileira de reumatologia*, 52, 152-174.
- MUTANDA, T., KARTHIKEYAN, S. & BUX, F. 2011. The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp. under batch conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164, 1126-1138.
- NAVARRO LÓPEZ, E., ROBLES MEDINA, A., GONZÁLEZ MORENO, P. A., ESTEBAN CERDÁN, L. & MOLINA GRIMA, E. 2016. Extraction of microalgal lipids and the influence of polar lipids on biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification. *Bioresource Technology*, 216, 904-913.
- NELSON, J. & PERKINS, E. 1991. *Em Analyses of fats, oils and lipoproteins*. American Oil Chemical Society, Champaign, USA.
- NEVES, F. D. F. 2013. Fixação de carbono através de microalgas nativas (*Chlamydomonas* sp.) cultivadas em diferentes concentrações de CO₂.
- NEVES, N. 2016. Produção de hidrogênio e metano via codigestão anaeróbia em reatores de dois estágios a partir de resíduo alimentar e lodo do tratamento de vinhaça.
- NEVES, O. S. C., SOUZA, A. S., COSTA, M. A., DE ALMEIDA SOUSA, L., VIANA, A. E. S. & NEVES, V. B. F. 2014. Persistência do cianeto e estabilização do pH em manipueira. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 8.
- OLGUÍN, E. J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology advances*, 22, 81-91.
- OLIVEIRA, M. A., DO LAGO, C. L., TAVARES, M. F. & DA SILVA, J. A. F. 2003. Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar utilizando detecção condutométrica sem contato. *Química Nova*, 26, 821-824.
- OLKIEWICZ, M., FORTUNY, A., STÜBER, F., FABREGAT, A., FONT, J. & BENGIOA, C. 2015. Effects of pre-treatments on the lipid extraction and biodiesel production from municipal WWTP sludge. *Fuel*, 141, 250-257.
- OMIROU, M., TZOVENIS, I., CHARALAMPOUS, P., TSAOULIS, P., POLYCARPOU, P., CHANTZISTROUNTSIOU, X., ECONOMOU-AMILLI, A. & IOANNIDES, I. M. 2018. Development of marine multi-algae cultures for biodiesel production. *Algal research*, 33, 462-469.
- ONUMAEGBU, C., MOONEY, J., ALASWAD, A. & OLABI, A. G. 2018. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 16-26.
- PANDEY, A., LEE, D. J., CHANG, J.-S., CHISTI, Y. & SOCCOL, C. R. 2018. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae*, Elsevier.

- PEREIRA, C. M., HOBUSS, C. B., MACIEL, J. V., FERREIRA, L. R., DEL PINO, F. B., MESKO, M. F., JACOB-LOPES, E. & COLEPICOLO NETO, P. 2012. Biodiesel derived from microalgae: advances and perspectives. *Química Nova*, 35, 2013-2018.
- PIRT, S. J., LEE, Y. K., WALACH, M. R., PIRT, M. W., BALYUZI, H. H. & BAZIN, M. J. 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, 33, 35-58.
- PLEISSNER, D., LAU, K. Y. & LIN, C. S. K. 2017. Utilization of food waste in continuous flow cultures of the heterotrophic microalga *Chlorella pyrenoidosa* for saturated and unsaturated fatty acids production. *Journal of cleaner production*, 142, 1417-1424.
- PONCE-CANCHIHUAMÁN, J. C., PÉREZ-MÉNDEZ, O., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R., TORRES-DURÁN, P. V. & JUÁREZ-OROPEZA, M. A. 2010. Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids in health and disease*, 9, 35.
- RAMIREZ, N. N. V. 2013. Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* Sp. em vinhaça.
- RAMLUKAN, K., MOODLEY, K. G. & BUX, F. 2014. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 116, 103-108.
- RAMOS, L. P., KOTHE, V., CÉSAR-OLIVEIRA, M., MUNIZ-WYPYCH, A., NAKAGAKI, S., KRIEGER, N., WYPYCH, F. & CORDEIRO, C. 2017. Biodiesel: Matérias-primas, tecnologias de produção e propriedades combustíveis. *Rev. Virtual Quim*, 9, 317-369.
- RASUL, I., AZEEM, F., SIDDIQUE, M. H., MUZAMMIL, S., RASUL, A., MUNAWAR, A., AFZAL, M., ALI, M. A. & NADEEM, H. 2017. *Algae Biotechnology: A Green Light for Engineered Algae. Algae Based Polymers, Blends, and Composites*. Elsevier.
- REBOUÇAS, C. S., DE FREITAS, A. G. B., DE SOUZA BERY, C. C., DA SILVA, I. P., DE OLIVEIRA JÚNIOR, A. M. & DA SILVA, G. F. 2015. Utilização de um sistema para a redução do ácido cianídrico presente na manipueira utilizando energia solar. *Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias*, 5, 1809-1819.
- RECALCATTI, J. F. 2016. Influência da privação de nitrogênio no cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* visando a produção de lipídeos.
- REGITANO, D. A. & MAB, L. 1987. UA Emprego de álcool etílico na extração de óleo de sementes de girassol (*Helianthus annuus*). *Ciência e tecnologia de alimentos*, 7, 1-14.
- RICHMOND, A. 2017a. *Handbook of microalgal mass culture (1986)*, CRC Press.
- RICHMOND, A. 2017b. *Microalgae of economic potential. Handbook of Microalgal Mass Culture (1986)*. CRC press.
- ROBBINS, L. 1980. LIQUID-LIQUID-EXTRACTION-A PRETREATMENT PROCESS FOR WASTE-WATER. *Chemical Engineering Progress*, 76, 58-61.
- ROMANO, L. E. 2018. Desenvolvimento de metodologia para determinação de diclofenaco em águas superficiais.
- SAHASRABUDHE, M. 1982. Measurement of lipase activity in single grains of oat (*Avena sativa* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59, 354-355.
- SALAMA, E.-S., KURADE, M. B., ABOU-SHANAB, R. A., EL-DALATONY, M. M., YANG, I.-S., MIN, B. & JEON, B.-H. 2017. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1189-1211.
- SASSI, P. G. P. 2016. Uso de microalgas com potencial para produção de biodiesel e mitigação de impactos ambientais.
- SCHMITZ, R., DAL MAGRO, C. & COLLA, L. M. 2012. Aplicações ambientais de microalgas. *Revista CIATEC-UPF*, 4, 48-60.
- SCHNEIDER, F. 1980. Zur extraktiven Lipid-Freisetzung aus pflanzlichen Zellen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 82, 16-23.

- SCOPARO, C. H. G. 2010. Remoção de CO₂ em fotobiorreatores utilizando efluentes petroquímicos.
- SCOTT, S. A., DAVEY, M. P., DENNIS, J. S., HORST, I., HOWE, C. J., LEA-SMITH, D. J. & SMITH, A. G. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology*, 21, 277-286.
- SEADER, J. D., HENLEY, E. J. & ROPER, D. K. 1998. *Separation process principles*.
- SHELEF, G. & SOEDER, C. J. 1980. *Algae Biomass: production and use*.
- SHEN, X.-F., LIU, J.-J., CHAUHAN, A. S., HU, H., MA, L.-L., LAM, P. K. S. & ZENG, R. J. 2016. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Research*, 17, 261-267.
- SHI, J., PODOLA, B. & MELKONIAN, M. 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *Journal of Applied Phycology*, 19, 417-423.
- SHIN, Y. S., CHOI, H. I., CHOI, J. W., LEE, J. S., SUNG, Y. J. & SIM, S. J. 2018. Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 258, 335-344.
- SKORUPSKAITE, V., MAKAREVICIENE, V., UBARTAS, M., KAROSIENE, J. & GUMBYTE, M. 2017. Green algae *Ankistrodesmus fusiformis* cell disruption using different modes. *Biomass and Bioenergy*, 107, 311-316.
- SOLOMONS, T. G. & FRYHLE, C. B. 2000. *Química Orgânica. Volume 1, Grupo Gen-LTC*.
- SOXHLET, F. 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes; von.
- STAMM, M. 2015. Effects of different microalgae supplements on fatty acid composition, oxidation stability, milk fat globule size and phospholipid content of bovine milk.
- STOKES, R., VAN EMON, M., LOY, D. & HANSEN, S. 2015. Assessment of algae meal as a ruminant feedstuff: Nutrient digestibility in sheep as a model species. *Journal of animal science*, 93, 5386-5394.
- SUALI, E. & SARBATLY, R. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 4316-4342.
- TANAMATI, A. A. C., TANAMATI, A., GANZAROLI, J. F., SANCHEZ, J. L. & SILVA, M. 2010. Estudo comparativo de métodos de extração de lipídios totais em amostras de origem animal e vegetal. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, Curitiba, 1, 73-77.
- TOLMASQUIM, M. T. 2012. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. *Estudos avançados*, 26, 247-260.
- TORZILLO, G., PUSHPARAJ, B., BOCCI, F., BALLONI, W., MATERASSI, R. & FLORENZANO, G. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass*, 11, 61-74.
- TREYBAL, R. 1981. *Mass-transfer*. McGraw-Hill International Editions.
- TREYBAL, R. E. 1963. *Methods of Calculation II. Stagewise Contact, Multicomponent Systems. Liquid Extraction*, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, New York, 275-276.
- UNDELAND, I., HÄRRÖD, M. & LINGNERT, H. 1998. Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 61, 355-365.
- VELJKOVIĆ, V. B., BIBERDŽIĆ, M. O., BANKOVIĆ-ILIĆ, I. B., DJALOVIĆ, I. G., TASIĆ, M. B., NJEŽIĆ, Z. B. & STAMENKOVIĆ, O. S. 2018. Biodiesel production from corn oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 531-548.
- VIDAL, I. C. D. A. 2016. Estudo da potencialidade de produção de biocombustíveis entre as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultivadas em águas residuárias.
- VIÊGAS, C. V. 2010. Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos.
- WAHIDIN, S., IDRIS, A. & SHALEH, S. R. M. 2014. Rapid biodiesel production using wet microalgae via microwave irradiation. *Energy Conversion and Management*, 84, 227-233.
- WANG, M., CHENG, H., CHEN, S., WEN, S., WU, X., ZHANG, D., YUAN, Q. & CONG, W. 2018. Microalgal cell disruption via extrusion for the production of intracellular valuables. *Energy*, 142, 339-345.

- YAHIA, E. M., CARRILLO-LÓPEZ, A., BARRERA, G. M., SUZÁN-AZPIRI, H. & BOLAÑOS, M. Q. 2019. Chapter 3 - Photosynthesis. In: YAHIA, E. M. (ed.) *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Woodhead Publishing.
- ZAMBIAZI, R. C., PRZYBYLSKI, R., ZAMBIAZI, M. W. & MENDONÇA, C. B. 2007. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 25.
- ZHAI, J., LI, X., LI, W., RAHAMAN, M. H., ZHAO, Y., WEI, B. & WEI, H. 2017. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. *Ecological engineering*, 108, 83-92.
- ZHANG, X., YAN, S., TYAGI, R. D., DROGUI, P. & SURAMPALLI, R. Y. 2014. Ultrasonication assisted lipid extraction from oleaginous microorganisms. *Bioresource Technology*, 158, 253-261.
- 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 minutíssima* Via Solventes. *HOLOS*, 2, 66-79.