

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis
Fernanda Silva Monção

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROALGAS DULCÍCOLAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E
BIOETANOL

Diamantina

2019

Fernanda Silva Monção

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROALGAS DULCÍCOLAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E
BIOETANOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para a obtenção de título de Doutor em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M737i

Monção, Fernanda Silva

Isolamento, seleção, identificação e caracterização de microalgas dulcícolas para a produção de biodiesel e bioetanol / Fernanda Silva Monção, 2019.

95 p. : il.

Orientadora: Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador: Alexandre Soares dos Santos

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Biocombustíveis. 2. *Chlorella sp.* 3. *Desmodesmus sp.* 4. *Phormidium sp.* 5. Glicerina. I. Pantoja, Lílian de Araújo. II. Santos, Alexandre Soares dos. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 660

FERNANDA SILVA MONÇÃO

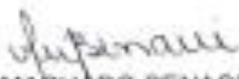
**ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROALGAS DULCÍCOLAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E
BIOETANOL**

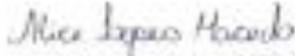
Tese apresentada ao DOUTORADO
EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM BIOCOMBUSTÍVEIS

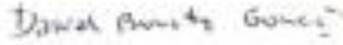
Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Lilian De
Araújo Pantoja

Data da aprovação : 12/07/2019


Prof. Dr.ª LILIAN DE ARAÚJO PANTOJA - UFVJM


Prof. Dr.ª VIVIAN MACHADO BENASSI - UFVJM


Dr.ª ALICE LOPES MACEDO - UFVJM


Prof. Dr. DANIEL BONOTO GONÇALVES - UFSJ


Prof. Dr. EMERSON DELANO LOPES - IFNMG


Prof. Dr. GUSTAVO MOLINA - UFVJM

DIAMANTINA

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a DEUS por tantos momentos bons e realizações que ele me proporcionou. Obrigada Senhor, por nunca me deixar desistir nos momentos mais difíceis, e por sempre me proporcionar força e coragem para seguir em frente. Agradeço também a minha Mãe, por todo apoio, força, conselhos e companhia no pouco tempo que tivemos juntas. Obrigada Mãe, por ser meu exemplo de honestidade, força, luta, determinação e perseverança. Obrigada por todo carinho e por sempre ter acreditado em mim. Obrigada a toda minha família, e ao meu amor Juan, que sempre me apoiou e foi mais que um companheiro. Com você ao meu lado foi tudo mais fácil!

Agradeço também aos professores Lílian Pantoja e Alexandre Soares dos Santos pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança a mim concedida e pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos dos laboratórios, em especial Marina Lemos, Dayane Abreu, Myrlene Ottone e Raquel Valinhas que de alguma forma contribuíram para a execução das etapas concluídas até agora. À Andressa Tironi que me auxiliou com as análises dos produtos deste trabalho e a todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Inteligência é a capacidade de se adaptar à mudança.”

Stephen Hawking

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos isolar, identificar, selecionar e caracterizar microalgas, contribuindo assim com informações sobre o uso destas para produção de biocombustíveis de 3ª geração. Além destes, foi alvo de estudo aumentar a produção de biomassa e dos teores de carboidratos e lipídios utilizando a glicerina como fonte de carbono para os cultivos mixotróficos e heterotróficos das microalgas previamente selecionadas. Visando uma maior produção de biomassa e compostos energéticos, os isolados foram cultivados em nove diferentes meios de cultura, com várias combinações de nutrientes e vitaminas. Sequencialmente, a microalga com melhor produção de biomassa e lipídios foi selecionada para testes em cultivos mixotróficos e heterotróficos, operados em batelada simples e alimentada utilizando diferentes combinações de concentrações de glicerina e NaNO_3 , em escala laboratorial. Após observar os melhores resultados, foi selecionada a melhor condição para produção de biodiesel que foi caracterizado qualitativamente. Foram identificados 3 gêneros, a *Chlorella* sp., a *Desmodesmus* sp. e a *Phormidium* sp.. As melhores produtividades de carboidratos foram encontradas nas microalgas *Chlorella* sp. e *Phormidium* sp. com $1,0 \text{ kg (m}^3)^{-1} \text{ ano}^{-1}$, enquanto que a maior produtividade lipídica foi alcançada com a *Chlorella* sp. com $0,7 \text{ kg (m}^3)^{-1} \text{ ano}^{-1}$, ambas no meio CHU. Considerando esses resultados a *Chlorella* sp. se destacou como uma importante produtora de carboidratos e lipídios, sendo selecionada para os novos cultivos. A condição de cultivo que proporcionou a melhor produtividade de biomassa foi encontrada no experimento AlgB23H, apresentando média de $150,4 \text{ Kg (m}^3)^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e, no experimento Alg23M que apresentou a maior concentração de lipídios com $28,1 \text{ Kg (m}^3)^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Desta forma, este estudo demonstrou a possibilidade de utilização da glicerina, subproduto do biodiesel, como fonte de carbono para promover o crescimento e maior acúmulo de lipídios da *Chlorella* sp e, que a condição mais promissora foi aquela resultante do uso combinado das fontes de carbono e nitrogênio. Quanto ao perfil graxo da *Chlorella* sp. foram encontrados diferentes ácidos graxos, os quais variaram de 12 a 18 átomos de carbono e, entre estes, houve a predominância de ácidos graxos monoinsaturados. O aproveitamento da glicerina como fonte de carbono foi satisfatório não só pelos resultados em produção de biomassa e lipídios, mas também por contribuir na reutilização de matérias-primas não convencionais para o cultivo de microalgas.

Palavras-chave: Biocombustíveis. *Chlorella* sp.. *Desmodesmus* sp.. *Phormidium* sp.. Glicerina.

ABSTRACT

This work aimed had as objectives to isolate, identify, select and characterize microalgae, to provide information on the use for 3rd generation biofuels. In addition, the objective was to increase biomass production and carbohydrate and lipid contents, using glycerin as a source of carbon for the mixotrophic and heterotrophic cultures of microalgae selected. Aiming at a higher production of biomass and energy compounds the isolates were cultivated in nine different culture media, with several combinations of nutrients and vitamins. Sequentially the microalgae with better production of biomass and lipids was selected for tests on mixotrophic and heterotrophic cultures conducted in simple and fed batch using different combinations of concentrations of glycerol and NaNO_3 , on laboratory scale. After observing the results, was selected the condition for production of biodiesel that was characterized qualitatively. Three genera were identified, *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp. and *Phormidium* sp. The best total carbohydrate productivities were found with the microalgae *Chlorella* sp. and *Phormidium* sp. with $1.0 \text{ kg (m}^3)^{-1} \text{ year}^{-1}$, while the highest lipid productivity was achieved with *Chlorella* sp. with $0.7 \text{ kg (m}^3)^{-1} \text{ year}^{-1}$, both in the culture media CHU. Considering these results, the *Chlorella* sp. stood out as an important producer of carbohydrate and lipids, being selected for the new cultures. The cultivation condition that provided the best biomass productivity was found in the experiment AlgB23H, presenting an average of $150.4 \text{ Kg (m}^3)^{-1} \text{ year}^{-1}$ and, in the experiment Alg23M which it was obtained the higher concentrations of lipids with $28.1 \text{ Kg (m}^3)^{-1} \text{ year}^{-1}$. Thus, this study demonstrated the possibility of reuse of glycerin, biodiesel co-product, as carbon source to promote growth and greater accumulation of lipid of *Chlorella* sp., and that the condition most promising was that resulting from the use combined of carbon and nitrogen sources. As for the fatty profile of *Chlorella* sp. were found different fatty acids, which varied from 12 to 18 carbon atoms, and of these there was a predominance of monounsaturated fatty acids. The use of glycerine as a carbon source was satisfactory, not only for the results in biomass and lipid production, but also for contributing to the reuse of non-conventional raw materials for the cultivation of microalgae.

Key words: Biofuels. *Chlorella* sp.. *Desmodesmus* sp.. *Phormidium* sp.. Glycerina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Benefícios e limitações da primeira, segunda e terceira geração de biocombustíveis	22
Figura 1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos para produção de biodiesel.....	25
Figura 2 – Fluxograma das atividades desenvolvidas na primeira etapa do estudo de microalgas com potencial para produção de bioetanol e biodiesel.....	32
Figura 3 – Fluxograma das atividades desenvolvidas na segunda etapa do estudo de microalgas com potencial para produção de bioetanol e biodiesel.....	33
Figura 4 – Micrografias da microalga <i>Chlorella</i> sp. isolada do Rio Pinheiro, Distrito de Sopa (MG).....	50
Figura 5 – Micrografias da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. isolada do tanque de peixes do departamento de Zootecnia da UFVJM	52
Figura 6 – Micrografias da microalga <i>Phormidium</i> sp. isolada do Rio Pinheiro-Distrito de Sopa/MG	53
Figura 7 – Comparação do crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. nos nove meios pela técnica de contagem celular	59
Figura 8 – Comparação do crescimento da microalga <i>Desmodesmus</i> sp. nos nove meios pela técnica de contagem celular	61
Figura 9 - Crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em batelada simples no meio CHU com adição de glicerina e cultivo controle sem glicerina	62
Figura 10 - Crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em batelada alimentada no meio CHU com adição de glicerina e cultivo controle sem glicerina	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de compostos de reserva de microalgas em porcentagem de matéria seca	15
Tabela 2 - Comparação das características de diferentes condições de cultivo	18
Tabela 3 - Composição da glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel metílico	21
Tabela 4 – Teor de lipídios de algumas espécies de microalgas dulcícolas sob diferentes condições de cultivos.....	26
Tabela 5 – Potencial de produção de óleo oriundo de matérias-primas vegetais e microalgas	27
Tabela 6 – Produtividade obtida em bioetanol a partir de diferentes matérias-primas	28
Tabela 7 – Preços mínimos de venda e custos de produtos derivados de microalgas	30
Tabela 8 – Composição dos meios de cultivo utilizados para o crescimento das microalgas dulcícolas isoladas	35
Tabela 9 - Concentrações de glicerina, nitrato de sódio e relação C/N dos cultivos da microalga selecionada em batelada simples	45
Tabela 10 – Concentrações iniciais de glicerina, nitrato de sódio e relação C/N dos cultivos da microalga selecionada em batelada alimentada	46
Tabela 11 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Chlorella</i> sp. em diferentes meios de cultivo	54
Tabela 12 - Produção de biomassa, teores de amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Chlorella</i> sp. em diferentes meios de cultivo.....	55
Tabela 13 – Produção de biomassa, teores de amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes meios de cultivo	56
Tabela 14 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Desmodesmus</i> sp. em diferentes meios de cultivo	57
Tabela 15 – Resultados das determinações analíticas do gênero <i>Phormidium</i> sp. cultivado no meio de crescimento CHU.....	58
Tabela 16 – Parâmetros cinéticos de crescimento celular da <i>Desmodesmus</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. nos diferentes meios de cultivo analisados.....	60
Tabela 17 - Taxas de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em cultivos com diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio.....	63
Tabela 18 – Produção de biomassa e teores amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Chlorella</i> sp. cultivada em meio CHU com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio.....	65

Tabela 19 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Chlorella</i> sp. cultivada em meio CHU com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio	66
Tabela 20 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Chlorella</i> sp. cultivada em meio CHU em batelada alimentada com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio.....	70
Tabela 21 – Produção de biomassa e teores amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de <i>Chlorella</i> sp. cultivada em meio CHU em batelada alimentada com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio.....	71
Tabela 22 – Ácidos graxos encontrados no óleo da microalga <i>Chlorella</i> sp.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

LabMBio - Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis

BBM –Bold's Basal Medium

LC – Meio L.C Oligo

CA – Meio Carefoot's

MC – Meio Closterium

CHU_{MT} – Meio CHU suplementado com solução de metais traços

LC_{MT} – Meio LC suplementado com solução de metais traços

AST – Açúcares solúveis totais

EROI – Energia de retorno por energia investida.

RCF – Força centrífuga relativa.

ANOVA – Análise de variância.

MS – Massa seca

µm – Micrometros

L – Litros

ha – Hectares

mg – Miligramas

g – Gramas

a – Anos

gal – Galão

UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A

mL – Militros

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

h – Horas

nm – nanômetros

D.O. – Densidade óptica

µx – Taxa de crescimento específica

tg – Taxa de geração

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

ATP – Adenosina Trifosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	Microalgas	14
3.2	Sistemas e condições de cultivo para o crescimento microalgal e produção de compostos de valor agregado	15
3.2.1	Crescimento fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico	18
3.2.2	Fontes de nutrientes de baixo custo.....	19
3.3	Biocombustíveis de Microalgas	21
3.3.1	<i>Biodiesel de microalgas</i>	25
3.3.2	<i>Bioetanol a partir de microalgas</i>	28
3.4	Situação atual dos biocombustíveis de terceira geração e perspectivas futuras ...	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Primeira etapa	34
4.1.1	Coleta, isolamento e identificação de microalgas	34
4.1.2	Produção de biomassa unialgal	37
4.1.3	Recuperação da biomassa unialgal.....	38
4.1.4	Avaliação do crescimento celular microalgal em cultivo fotoautotrófico	39
4.2	Segunda etapa	40
4.2.1	Seleção de microalga para otimização da produção de biomassa	40
4.2.2	Caracterização química da biomassa unialgal	40
4.2.2.1	Determinação do teor de lipídios.....	40
4.2.2.2	Determinação do teor de amido e açúcares solúveis totais	41
4.2.2.3	Análise de carboidratos totais.....	42
4.2.2.4	Análise de proteínas	43
4.2.3	Avaliação das condições de crescimento da microalga selecionada	43
4.2.3.1	Cultivo em batelada simples.....	43

4.2.3.2	Cultivo em batelada alimentada.....	45
4.2.4	Avaliação do crescimento celular dos cultivos.....	46
4.2.5	Quantificação de nitrato.....	47
4.2.6	Quantificação de glicerina.....	48
4.3	Análise dos ácidos graxos da microalga selecionada.....	48
4.4	Análise dos dados.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	Primeira etapa.....	50
5.2	Segunda etapa.....	61
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas ocasionadas pela queima de combustíveis fósseis vem ameaçando os ecossistemas e conseqüentemente o equilíbrio do planeta. Desta forma, a redução da dependência por combustíveis fósseis através do uso de biocombustíveis está sendo vista como uma prática viável (CALIXTO *et al.*, 2018; ISA; GANDA, 2018). Além desse fato, tem-se o aumento populacional que traz consigo uma maior demanda por energia (SHUBA; KIFLE, 2018; ISA; GANDA, 2018) e assim, instiga a busca por combustíveis renováveis, que garantam um fornecimento contínuo de energia de forma sustentável (JAYAKUMAR *et al.*, 2017; BIBI *et al.*, 2017; RASLAVIČIUS *et al.*, 2018; ELRAYIES, 2018).

Neste contexto, a terceira geração de biocombustíveis, aqueles obtidos a partir de micro-organismos fotossintéticos capazes de acumular gorduras e carboidratos, surge como uma alternativa para atender às demandas do setor automotivo e energético. Contudo, há a necessidade de vencer uma série de desafios para que a produção desses micro-organismos possa se tornar viável economicamente como fonte de energia. Dentre estes desafios, destaca-se a otimização da produção de biomassa microalgal associada ao maior acúmulo de compostos como lipídios e carboidratos (SHUBA; KIFLE, 2018).

Visando uma alternativa, diferentes ações estão sendo sugeridas e testadas para superar as dificuldades encontradas na produção dos biocombustíveis microalgais. Entre estas, destaca-se o uso das formas de crescimento heterotrófico ou mixotrófico de microalgas, suplementados com carbono orgânico. Uma relevante estratégia que vem despertando interesse da comunidade científica refere-se ao uso de fontes de carbono orgânico provenientes de subprodutos industriais. Este fato, além de reduzir os custos de produção, ainda, traria benefícios para o ecossistema por contribuir na biotransformação de produtos de descarte.

Nesta temática é possível destacar o glicerol bruto, subproduto da produção do biodiesel, que nas últimas décadas tem gerado preocupações devido às dificuldades quanto ao seu descarte que ocorre em grande quantidade (ABOMOHRA *et al.*, 2018). O glicerol pode ser um eficiente suplemento aos cultivos microalgais, podendo proporcionar maiores rendimentos de biomassa e produtividades lipídicas e de carboidratos, fato que aumentaria a viabilidade de produção de biodiesel e bioetanol microalgal.

Baseado no acima exposto o presente estudo teve por finalidade contribuir com o conhecimento científico a fim de oferecer subsídios para futuras aplicações de técnicas que

possibilitem uma maior produção de microalgas com potencial para biocombustíveis. Para tanto, foram propostos os objetivos descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo isolar, identificar, selecionar e caracterizar microalgas dulcícolas com potencial para a produção de biodiesel e bioetanol.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar microalgas de cursos e corpos d'água doce;
- Identificar taxonomicamente as microalgas isoladas;
- Caracterizar a biomassa microalgal quanto à composição de lipídios e carboidratos;
- Avaliar os efeitos combinados da glicerina e nitrato de sódio na produção de biomassa, lipídios e carboidratos de microalgas submetidas às condições de crescimento mixotrófico e heterotrófico em comparação com o fotoautotrófico;
- Determinar a composição química do óleo obtido da microalga com maior produção de lipídios.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Microalgas

As microalgas e cianobactérias são micro-organismos unicelulares fotossintéticos capazes de utilizar a energia da luz para converter CO₂ e água em biomassa (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; BRASIL *et al.* 2017). As cianobactérias possuem estrutura celular procariótica e junto com as microalgas eucarióticas são usualmente incluídas na mesma categoria denominada microalgas, termo que não possui efeito taxonômico (DEMIRBAS, 2010; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011; KLIGERMAN; BOUWER, 2015; ALMEIDA, *et al.*, 2017; CALIXTO *et al.*, 2018). Estes micro-organismos apresentam dimensões variando até algumas centenas de micrometros (µm) (SUGANYA *et al.*, 2016) e podem ser encontrados em ambientes terrestres e aquáticos (marinhos ou dulcícolas), podendo apresentar-se em colônias, isolados ou em filamentos (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; SUGANYA *et al.*, 2016).

A biodiversidade microalgal é estimada entre 200.000 a 800.000 espécies, todavia, destas apenas 30.000 foram descritas e caracterizadas (EBENEZER *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2017). Dentre esta biodiversidade, a classe *Chlorophyceae*, conhecida como microalgas verdes e a classe *Cyanophyceae*, representadas pelas cianobactérias azul-esverdeadas, são as microalgas mais utilizadas na obtenção de matéria-prima para biocombustíveis. Essas duas classes possuem diferentes aplicações nas indústrias biotecnológicas e vem ganhando destaque como matéria-prima promissora nesta área (SALAMA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017a; CALIXTO *et al.*, 2018; ELRAYIES, 2018).

As microalgas em geral podem produzir e estocar carboidratos, proteínas, lipídios e outros compostos de valor agregado (ULLAH *et al.*, 2015; ZHU, 2015) (Tabela 1), e, portanto, possuem grande potencial como matéria-prima para biocombustíveis. No entanto, as concentrações destes compostos podem sofrer influência dos fatores ambientais como luminosidade e temperatura, por exemplo, com as condições de cultivo e podem variar entre as espécies (PANDEY *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Teores de compostos de reserva de microalgas em porcentagem de matéria seca

Microalgas	Carboidratos Totais (%MS)*	Lipídios (%MS)*	Proteínas (%MS)*	Referências
<i>Chlorella protothecoides</i>	-	43-46 ¹	-	Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella protothecoides</i>	-	50,5 ²	-	Shen <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	-	51,1 ³	-	Liu <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51	-	-	Ho <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	50 ⁴	-	Yeh <i>et al.</i> (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	40-53 ⁵	-	Yeh; Chang (2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17	14-22	51-58	Spolaore <i>et al.</i> (2006)
<i>Chlorella emersonii</i>	41	-	-	Illman <i>et al.</i> (2000)
<i>Chlorella emersonii</i>	-	25-63	-	Mata <i>et al.</i> (2010)
<i>Desmodesmus</i> sp.	-	53,8±6.0 ⁶	-	Ho <i>et al.</i> (2014)
<i>Botryococcus braunii</i>	-	45,0±4.0 ⁷	-	Nascimento <i>et al.</i> (2013)
<i>Botryococcus terribilis</i>	-	49,0±1.5 ⁷	-	
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	53	-	-	John <i>et al.</i> (2011)
<i>C.reinhardii</i>	45	-	-	
<i>C.reinhardii</i>	17	21	48	
<i>Anabaena Cylindrica</i>	25-30	4-7	43-56	Dragone <i>et al.</i> (2010)
<i>Spirogyra</i> sp.	33-64	11-21	6-20	
<i>Dunaliella salina</i>	32	6	57	
<i>Porphyridium cruentum</i>	40-57	9-14	28-39	
<i>Spirulina maxima</i>	13-16	6-7	60-71	Satyanarayana <i>et al.</i> (2011)
<i>Anabaena cylindrica</i>	25-30	4-7	43-56	
<i>Kirchneriella lunaris</i>	75	12,5	3,9	Salam <i>et al.</i> (2016)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52	16-4	8,1	Suganya <i>et al.</i> (2016)

*MS: Massa Seca. 1. Crescimento heterotrófico com hidrolisado de alcachofra de Jerusalém. 2. Crescimento heterotrófico com adição de KNO₃. 3. Crescimento heterotrófico com glicose. 4. Crescimento fotoheterotrófico com adição de ácido acético 5. Crescimento mixotrófico com adição de Co₂ e glicose. 6. Restrição de nitrogênio. 7. Condições de crescimento padrão.

3.2 Sistemas e condições de cultivo para o crescimento microalgal e produção de compostos de valor agregado

As microalgas podem ser fotoautotróficas, embora também possam crescer sobre condições mixotróficas e heterotróficas (JAYAKUMAR *et al.*, 2017; GONZALEZ-FERNANDEZ; MUÑOZ, 2017; WANG *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017 a,b). O crescimento

nestas duas últimas condições exige o uso de fotobiorreatores adequados às necessidades desses organismos (ELRAYIES, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018). Segundo Sirajunnisa; Surendhiran (2016) inúmeros fotobiorreatores podem ser utilizados para a produção de microalgas, porém, devem ser desenvolvidos modelos que sejam adequados para o crescimento microalgal com a finalidade de obter uma significativa quantidade de biomassa.

O cultivo para a produção de biomassa pode ser realizado em diversos sistemas com volumes e características diferentes (PANDEY *et al.*, 2014; GONZALEZ-FERNANDEZ; MUÑOZ, 2017). Entretanto, muitos fotobiorreatores com configurações distintas já foram propostos, contudo, nenhum pode ser considerado ótimo a todas às condições de cultivo de microalgas (PANDEY *et al.*, 2014). Segundo Klein *et al.* (2018) ainda há a necessidade de se discutir sobre o melhor sistema para a produção de biomassa de microalgas em larga escala, uma vez que os já existentes apresentam vantagens e desvantagens.

A seleção de um biorreator adequado deve ser baseada na apropriada distribuição da intensidade de luz para não provocar fotoinibição; na melhor taxa de liberação de oxigênio formado no processo de fotossíntese, evitando a autointoxicação da cultura, e em um sistema de agitação eficiente que não provoque estresse da cultura por excesso de agitação e ainda, que evite a deposição de material biológico (ROCHA, 2012; RAZZAK *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013). Estas condições estão atreladas ao fato de que as microalgas podem ser metabolicamente afetadas em resposta a alguns fatores físico-químicos.

Dentre os vários fatores que afetam o desenvolvimento microalgal, tem-se a luminosidade por ser essencial para a fixação do carbono durante a fotossíntese, pois a quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, influenciando conseqüentemente na produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas microalgais. A luminosidade possui ação direta sobre as células, sendo assim considerada um dos principais fatores que vem sendo estudados e utilizados na manipulação da composição química da biomassa (KHAJEPOUR *et al.*, 2015; CHANDRA *et al.*, 2017; JAYAKUMAR *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

A temperatura e o pH também são considerados fatores cruciais para o crescimento microalgal (KATIYAR *et al.*, 2017; CALIXTO *et al.*, 2018). O aumento da temperatura pode acarretar em um acréscimo no teor de proteínas e uma diminuição nos teores de carboidratos e lipídios das células. Enquanto que, a diminuição da temperatura é responsável pelo aumento de insaturações dos ácidos graxos, afetando deste modo o conteúdo total de lipídios (SU *et al.*, 2016). O conhecimento acerca da alcalinidade do meio de cultivo

das microalgas também é importante. Conforme Rocha (2012), o crescimento das microalgas em cultivo envolve o consumo de dióxido de carbono dissolvido no meio, o que provoca o aumento do pH do sistema e pode ocasionar uma toxicidade aos micro-organismos.

Considerando os fatores indispensáveis para o crescimento microalgal tem-se a demanda de macro e micronutrientes no seu cultivo. As composições químicas destes cultivos são derivadas de formulações básicas de meios de culturas bem sucedidos para determinadas espécies de microalgas (SUN; SUN, 2012; KLEIN *et al.*, 2018; CALIXTO *et al.*, 2018). Os macronutrientes como o carbono, que compõem cerca de 50% da biomassa microalgal (ZHOU *et al.*, 2017b); o nitrogênio, elemento básico na formação de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes, e o fósforo, que são componentes de suma importância para o crescimento celular, bem como para a síntese de lipídios e carboidratos (ROCHA, 2012; GONZALEZ-FERNANDEZ; MUÑOZ, 2017).

Sirajunnisa; Surendhiran (2016) reportam que as limitações dos macronutrientes citados acima causa estresse às microalgas, obrigando-as a alterar suas rotas metabólicas, assim como pode ocasionar um aumento da obtenção de triglicerídeos em diferentes espécies microalgais. Esses autores mencionam ainda, que a adição de outros macronutrientes como Na, K, Ca, Mg e S e alguns micronutrientes como, Fe, Mn, Zn, Co, Cu e Mo, também devem ser acrescentados no meio de cultivo para que haja um efetivo crescimento microalgal e ainda, um eficaz funcionamento do metabolismo celular. Neste sentido, sabe-se da importância em avaliar a melhor condição para o crescimento de cada indivíduo, considerando a proporção ótima dos nutrientes para cada cultivo que as microalgas serão submetidas.

Os cultivos microalgais realizados em meios de cultura inadequados em relação à disponibilidade nutricional ocasionam um estresse químico (MAGRO *et al.*, 2016; KATIYAR *et al.*, 2017; SHUBA; KIFLE, 2018) e, conseqüentemente, inviabilizam o seu crescimento. Todavia, algumas microalgas em condições de estresse nutricional podem estocar grandes quantidades de materiais de reserva ricos em energia, como os triglicerídeos e o amido, o que proporciona um melhor rendimento de biodiesel e bioetanol, respectivamente (ELRAYIES, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018).

As condições de cultivos relatadas acima vêm sendo alvo de estudos na última década (CHEN *et al.*, 2013; CHEN; LI; LAI; 2014; ZHU, 2015; SILVA; BERTUCCO, 2016; STANISLAV; CHRISTINA, 2016; RODRÍGUEZA *et al.*, 2016; SALAMA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017 a, b; CALIXTO *et al.*, 2018; ELRAYIES, 2018) por serem determinantes no cultivo eficiente das microalgas. Estes estudos visam promover maior

produção de biomassa com fins de aplicação em diferentes bioprocessos, que geram produtos de interesse econômico como os biocombustíveis de terceira geração, alvo desse estudo.

3.2.1 Crescimento fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico

Determinadas espécies de microalgas são capazes de assimilar tanto o carbono inorgânico quanto o orgânico (KIM *et al.*, 2013; TERRADO *et al.*, 2017), podendo assumir muitos tipos de metabolismos como, por exemplo, fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico, representados na Tabela 2. A compreensão destes mecanismos de assimilação se torna fundamental para as estratégias dos cultivos microalgais destinados à produção de biocombustíveis (LI *et al.*, 2014; CHEN; JIANG, 2017; PALIWAL *et al.*, 2017).

As microalgas que utilizam predominantemente a fotossíntese são denominadas fotoautotróficas, utilizando radiação solar como fonte de energia e convertendo o CO₂ a biomoléculas, como carboidratos e ácidos graxos (CHEN; JIANG, 2017). Este mecanismo de assimilação do carbono pode mitigar as emissões de CO₂ derivadas das atividades humanas, no entanto, o cultivo fotoautotrófico permite que a luz seja um fator limitante à produção de biomassa, devido ao auto-sombreamento celular provocado durante o tempo deste cultivo (LI *et al.*, 2014). Uma alternativa para contornar este problema e possível dificuldade de uma produção de biomassa satisfatória seria o cultivo mixotrófico. Neste tipo de cultivo, a fixação de dióxido de carbono durante a fotossíntese pode ser aumentada devido à assimilação simultânea de outras fontes de carbono orgânico (SUBRAMANIAN; YADAV; SEN, 2016; PODDAR; SEN; MARTIN, 2018). O carbono inorgânico é fixado pelo mecanismo fotossintético em uma rota essencialmente redutora. Por outro lado, o carbono orgânico é assimilado do meio de cultivo e, em seguida, metabolizado para gerar energia e produzir outros metabólitos (PEREZ-GARCIA; BASHAN, 2015).

Tabela 2 - Comparação das características de diferentes condições de cultivo

Condição de Cultivo	Fonte de Energia	Fonte de Carbono
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz e/ou composto orgânico	Inorgânico e/ou orgânico

Fonte: Chen *et al.*, 2011 modificado.

O cultivo heterotrófico é capaz de produzir concentrações relativamente elevadas de biomassa e pode ser usado como segundo estágio após um primeiro estágio de crescimento fotoautotrófico (RISMANI-YAZDI *et al.*, 2015; PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016a). Este tipo de metabolismo ocorre na ausência de luz, em que algumas espécies microalgais são capazes de metabolizar o carbono orgânico presente no meio de cultivo (SALAMA *et al.*, 2017). Entretanto, não são todas as microalgas que possuem capacidade de se beneficiar dessa rota de assimilação. Algumas espécies de microalgas não possuem transportadores específicos para a absorção de açúcares ou outras fontes de carbono orgânico, ou então, possuem o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) incompleto, com a ausência da enzima α -cetoglutarato desidrogenase, essencial para a produção de ATP (Adenosina Trifosfato) (SUBHASH *et al.*, 2017). Além disso, sistemas de microalgas de dois estágios requerem um estágio intermediário de colheita que agregue complexidade e custos ao processo (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016b).

3.2.2 Fontes de nutrientes de baixo custo

A produção da biomassa microalgal e seus bioprodutos ainda podem ser considerados economicamente viáveis, todavia, com os elevados custos de cultivo, colheita e processamento, isso ainda não é possível (LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017). De acordo com Santana *et al.* (2017) uma redução nos custos pode ser alcançada se o CO₂, nutrientes e água utilizados no cultivo de microalgas forem obtidos a baixo custo.

A maioria das pesquisas utilizando o cultivo de microalgas com outras fontes de carbono, exploraram principalmente duas fontes de carbono orgânico, a glicose (LIU *et al.*, 2011; MORALES-SÁNCHEZ *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2013; RÍOS *et al.*, 2017) e acetato (HEIFETZ *et al.*, 2000; MOON *et al.*, 2013; MATSUDO *et al.*, 2014), em uma tentativa de alcançar melhores resultados na produção de biomassa microalgal e dos compostos que estas acumulam. No entanto, uma das barreiras associadas ao cultivo microalgal são os custos com nutrientes, como os citados acima (CALIXTO *et al.*, 2018). Contudo, existem vários possíveis subprodutos provenientes de efluentes urbanos, industriais e agrícolas que são propostos e vem sendo testados (MITRA; LEEUWEN; LAMSA, 2012; DUBEY *et al.*, 2015; LOWREY, BROOKS; MCGINN, 2015; LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Os subprodutos provenientes das cadeias de produção de biocombustíveis, como por exemplo do bioetanol de cana-de-açúcar e do biodiesel, vem se destacando também na produção de microalgas e de mais biocombustíveis da terceira geração em trabalhos recentes (MU *et al.*, 2015; KATIYAR *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2017; SASSI *et al.*, 2017). Dentre estes, a glicerina, derivada da produção de biodiesel, pode ser utilizada tanto no cultivo microalgal heterotrófico, quanto no mixotrófico. Este coproduto se destaca como uma fonte econômica para o suprimento de energia e de carbono, e é um soluto compatível com as enzimas e membranas das microalgas, não apresentando quase nenhum efeito tóxico mesmo em altas concentrações (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011; CABANELAS *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2015; NAJAFABADI *et al.*, 2015; PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016a; PODDAR; SEN; MARTIN, 2018).

Determinadas espécies microalgais são capazes de assimilar a glicerina do meio, e com isso aumentar sua taxa de crescimento. Quando microalgas crescem em substratos como a glicerina, ela entra nas células por meio de difusão simples, e dentro das células é utilizada como uma molécula osmorregulatória. Essa capacidade de microalgas em utilizar fontes de carbono orgânico para seu crescimento baseia-se na disponibilidade do transporte desse nutriente para dentro da célula e na presença das vias enzimáticas para converter a fonte de carbono em precursores adequados para o seu metabolismo (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

A maior demanda de biodiesel aumentou significativamente a produção de glicerina bruta como subproduto, e isso proporciona uma eficiente fonte de carbono para microbiologia industrial (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; PODDAR; SEN; MARTIN, 2018) podendo favorecer a produção de microalgas. Segundo Zhu *et al.* (2017), para cada dez litros de biodiesel produzido é gerado aproximadamente um litro de glicerina bruta. Caso esta glicerina bruta produzida não seja refinada para uso nas indústrias ou em outras finalidades, esta pode vir a ser um possível problema ambiental devido ao seu descarte inadequado (ABOMOHRRA *et al.*, 2018).

A glicerina bruta contém basicamente o glicerol (20-96%), ácidos graxos livres, sabões, sais e álcool (metanol ou etanol), em porcentagens que variam de acordo com o processo adotado pela unidade de produção de biodiesel (Tabela 3) (HU *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2016; CHEN; JIANG, 2017). Devido à essa composição citada, além de outros resquícios da reação, este subproduto pode exigir tratamentos de purificação para que possa ser descartado adequadamente ou reaproveitado pelas indústrias como uma fonte promissora de carbono (CHEN *et al.*, 2018). Esse fato beneficiaria os cultivos microalgais que poderiam ser otimizados com essa fonte de carbono a menores custos.

Tabela 3 - Composição da glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel metílico

Parâmetros	Chen <i>et al.</i> , (2018)	Katiyar <i>et al.</i> , (2017)	Gao <i>et al.</i> , (2016)	Hu <i>et al.</i> , (2012)
Sabão	21,1	48,5	-	26,2
Cinzas	2,3	2,35	-	2,7
Metanol	15,3	21	15-20	10,9
Glicerol	31,8	28,5	45-55	33,3
Água	24,4	-	25-35	18,2

3.3 Biocombustíveis de Microalgas

A procura por fontes energéticas renováveis e viáveis economicamente, cresce cada vez mais na sociedade atual (CHAUDRY; BAHRI; MOHEINANI, 2016; ISA; GANDA, 2018). Além disso, têm-se os problemas ambientais decorrentes do uso dos combustíveis fósseis que estimulam o uso de biomassas renováveis, como forma de substituir total ou parcialmente os combustíveis derivados do petróleo (BIBI *et al.*, 2017; ISA; GANDA, 2018).

Os biocombustíveis não favorecem o acúmulo de gases de efeito estufa na atmosfera (ELRAYIES, 2018; CALIXTO *et al.*, 2018; JI; LONG, 2016; ISA; GANDA, 2018) e portanto, se constituem em um uso ambientalmente sustentável. Segundo Calixto *et al.* (2018) os biocombustíveis são uma alternativa promissora para o futuro econômico e sustentável das necessidades energéticas humanas.

Os biocombustíveis podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com a matéria-prima e a tecnologia de conversão utilizada para a sua produção, sendo denominadas como de primeira, segunda e terceira geração, apresentando distintos benefícios e limitações, conforme apresentado no Quadro 1. Contudo, essa classificação e denominação podem variar de acordo com alguns autores (DOSHI *et al.*, 2016; SALADINI *et al.*, 2016; SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016; ELRAYIES, 2018).

O bioetanol de primeira geração é produzido a partir de açúcares provenientes da cana-de-açúcar, beterraba-sacarina, milho, trigo e mandioca, por exemplo (SALADINI *et al.*, 2016). Já o biodiesel de primeira geração é proveniente da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016). No entanto, os

biocombustíveis de primeira geração apresentam entraves ambientais na utilização de algumas matérias-primas, como o balanço energético da produção pouco favorável e as grandes extensões de terra e quantidades de água necessárias para o desenvolvimento das mesmas (KOSINKOV *et al.*, 2015; DOSHI *et al.*, 2016). Além disso, algumas culturas que são empregadas como matérias-primas na produção destes combustíveis podem ser destinadas à alimentação, gerando assim, uma inconformidade socioeconômica e ineficiente produção de energia por área (ELRAYIES, 2018).

A segunda geração de biocombustíveis são produzidos à partir de culturas lignocelulósicas, principalmente resíduos florestais e agrícolas para a produção de bioetanol e, resíduos do petróleo e do óleo de cozinha para produção de biodiesel (DOSHI *et al.*, 2016; STANISLAV; CHRISTINA, 2016; ELRAYIES, 2018). Estes são considerados mais sustentáveis em comparação aos de primeira geração, e seu uso diminui a procura por terras agricultáveis, que poderiam ser utilizadas para a produção de alimentos, assim como reduz o impacto nas concentrações de CO₂ emitidas à atmosfera (KOSINKOV *et al.*, 2015; ELRAYIES, 2018). Todavia, a segunda geração de biocombustíveis ainda utiliza ineficientes tecnologias para o tratamento e conversão dos materiais lignocelulósicos, associadas aos gastos de energia direcionados a coleta e transporte da matéria-prima que implicam na inepta aplicação comercial (ELRAYIES, 2018; SUGANYA *et al.*, 2016).

Quadro 1– Benefícios e limitações da primeira, segunda e terceira geração de biocombustíveis

Tipo de Biocombustível	Benefícios	Limitações
Primeira Geração	<ul style="list-style-type: none"> • Custos de produção mais baratos; • Comunidades carentes economicamente conseguem acesso a fontes renováveis de combustíveis; • Benefícios para as comunidades agrícolas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Emissões elevadas e perda de biodiversidade; • Competição por terras com culturas alimentícias; • Competição por recursos agrícolas; • Baixo EROI*.
Segunda Geração	<ul style="list-style-type: none"> • Mais alto EROI* do que aquela obtida na 1^a Geração; • Menor pressão sobre a demanda por recursos agrícolas e terras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode aumentar a pressão para converter as áreas florestais existentes em terras agrícolas; • Fornecimento insuficiente se dependente de resíduos de biomassa.

Terceira Geração

- Utiliza efluentes residuais no cultivo; Contribui no sequestro de carbono;
 - Proporciona benefícios no tratamento de águas residuais;
 - Podem ser cultivadas em terras não cultiváveis;
 - Tem potencial para coprodutos de alto valor;
 - Reduz os impactos a biodiversidade;
 - Desenvolvimento potencial de longo prazo da indústria, emprego e crescimento econômico.
- Tecnologia recente, que demanda custos elevados nos processos de cultivo;
 - Elevado gasto de energia necessário para coleta e processamento biotecnológicos;
 - Dependência de combustíveis fósseis em algumas etapas da produção, o que findam por encarecer o processo.

Fonte: DOSHI *et al.*, 2016; ELRAYIES, 2018; VOLOSHIN *et al.*, 2016. *EROI= (Energia utilizável adquirida)/(Energia gasta).

A terceira geração inclui combustíveis obtidos à partir de micro-organismos fotossintéticos como as microalgas (DOSHI *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2017; CALIXTO *et al.*, 2018). De acordo com Raslavičius; Striugas; Felneris (2018) as microalgas são consideradas a fonte de biomassa com maior capacidade para enfrentar os desafios do futuro quanto a dependência energética. Tais micro-organismos são capazes de gerar diferentes metabólitos, bem como concentrações elevadas e acúmulo de compostos tais como: proteínas, lipídios e carboidratos (STANISLAV; CHRISTINA; 2016). Suganya *et al.* (2016) reportam que além da elevada produtividade de biomassa, o cultivo das microalgas necessita de menor volume de água e espaço para cultivo, quando comparado à produção de culturas agrícolas; podendo este ser realizado em áreas não agricultáveis e com o uso de água não potável.

O uso das microalgas em geral para produção de biocombustíveis apresenta como benefício adicional à maior capacidade de biomitigação de carbono, que se mostra 10 a 50 vezes maior que a das plantas. Desta forma, poderia aumentar os níveis de fixação de CO₂ (ZHOU *et al.*, 2017a), diminuindo os impactos ambientais e retardando o efeito estufa (ZHU, 2015; RODRÍGUEZA *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2017b; ELRAYIES, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018)

Gonzalez-Fernandez e Muñoz (2017) reportaram que os primeiros estudos de microalgas visando biocombustíveis iniciaram em 1920 na Alemanha, onde pesquisadores encontraram cerca de 80% de lipídios por massa seca na microalga do gênero *Chlorella*, empregando estresse nutricional no seu cultivo. Estes autores relataram ainda, que o biodiesel foi o biocombustível mais estudado com cerca de 417.000 publicações, seguido do biohidrogênio com 303.000 e o bioetanol com 273.000. O papel das microalgas como fonte

energética foi corroborado com diversas publicações nos últimos anos, que evidenciam uma elevada produção de biomassa, com alto teor de carboidratos, e óleos, em média de 70% por unidade de peso seco (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016; SILVA; BERTUCCO, 2016; RODRÍGUEZA *et al.*, 2016; CALIXTO *et al.*, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018; ELRAYIES, 2018; RASLAVIČIUS; STRIUGAS; FELNERIS, 2018; ISA; GANDA, 2018).

As microalgas apresentam um elevado potencial energético, contudo para que possam se tornar viáveis economicamente como fontes de energia, há a necessidade de vencer uma série de barreiras, dentre estas, a otimização da produção de biomassa (SUGANYA *et al.*, 2016; SHUBA; KIFLE, 2018; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018), a produção e acúmulo de lipídios e carboidratos em suas células, com maior velocidade de crescimento, e, melhores processos de coleta e cultivo (ELRAYIES, 2018; RASLAVIČIUS; STRIUGAS; FELNERIS, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018).

A seleção de espécies de microalgas para a eficiente produção de combustível precisa ser avaliada com base em determinados parâmetros, como a taxa de crescimento que pode significativamente reduzir o tempo de cultivo e, portanto, os custos. Da mesma forma, pelos teores de lipídios e amido que podem conferir uma elevada produtividade de biodiesel e bioetanol, respectivamente (DOSHI *et al.*, 2016; SHUBA; KIFLE, 2018; CALIXTO *et al.*, 2018).

A biomassa microalgal obtida ao fim do processo de cultivo pode ser convertida em diversas fontes alternativas de energia, como o hidrogênio, metano, biomassa para combustão e gaseificação, digestão anaeróbica da biomassa remanescente e, sobretudo o biodiesel e bioetanol (SILVA; BERTUCCO, 2016; SHUBA; KIFLE, 2018). A produção de energia a partir desta biomassa envolve bioquímica, processos termoquímicos, químicos e de combustão direta.

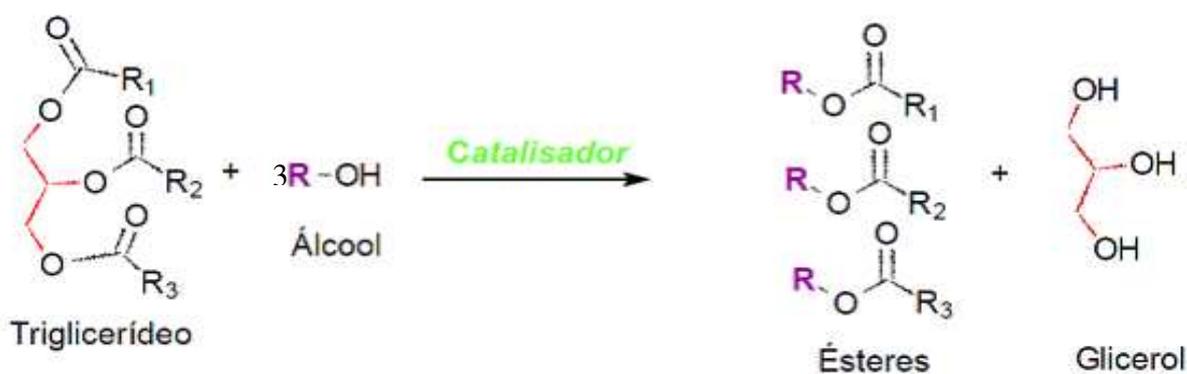
O biodiesel e bioetanol oriundos de microalgas serão ressaltados nesta temática, por serem de maior interesse neste estudo.

3.3.1 Biodiesel de microalgas

O biodiesel pode ser o substituto ideal para o diesel de origem fóssil, já que quimicamente apresenta composição semelhante do diesel mineral (VOLOSHIN *et al.*, 2016; DEMIRBAS, 2008), sendo um combustível biodegradável, com baixa emissão de compostos poluentes na atmosfera quando comparado ao diesel de petróleo (CHISTI, 2013; ELRAYIES, 2018).

A obtenção do biodiesel pode ser realizada por transesterificação, que consiste em uma reação entre um triglicerídeo, principal constituinte dos óleos e gorduras, e um álcool de cadeia curta em excesso de produzindo ésteres de ácidos graxos e glicerol (Figura 1) (SALAR-GARCÍA *et al.*, 2016; SHUBA; KIFLE, 2018). Esses autores mencionam ainda, que a adição de um catalisador aumenta a taxa de conversão e por consequência reduz o tempo de reação. De acordo com Shuba; Kifle (2018) a transesterificação é uma das alternativas mais eficientes para produção de biocombustível microalgal.

Figura 1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos para produção de biodiesel



Nos últimos anos, o biodiesel comercializado foi produzido a partir de culturas oleaginosas como, por exemplo, soja, colza e girassol (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016). Todavia, para a produção de biocombustíveis, a utilização destas culturas exige quantidades significativas de água e terras agricultáveis (RODRÍGUEZA *et al.*, 2016), levando a uma competição entre a utilização destes recursos para culturas energéticas e culturas alimentícias. Na busca de fontes de matérias-primas sustentáveis e que não

prejudiquem a produção de alimentos, as microalgas se sobressaem, com uma elevada capacidade de sintetizar lipídios, sendo assim, selecionadas como uma eficiente fonte de biodiesel para substituir o diesel fóssil (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016; MILANO *et al.*, 2016).

O acúmulo de lipídios em microalgas ocorre naturalmente como um mecanismo para armazenamento de energia principalmente em condições desfavoráveis (LI *et al.*, 2011; RAWAT *et al.*, 2013). Esse teor lipídico e os componentes podem variar entre as diferentes espécies, bem como pelas condições de cultivo as quais são submetidas (Tabela 4), sendo divididos basicamente em lipídeos neutros e lipídeos polares, como os fosfolipídeos. Os lipídeos neutros, como os triglicerídeos, são considerados como o principal material para a produção do biodiesel (HUANG *et al.*, 2010; MILANO *et al.*, 2016). De acordo com Salam; Velasquez-orta; Harvey (2016) dentre os gêneros de microalgas dulcícolas, a *Chlorella* sp. e o *Botryococcus* sp. possuem um alto rendimento produtivo em óleo, o que as tornam fontes eficientes para produção de biodiesel. Estes autores relatam ainda, que tais microalgas podem acumular cerca de 86% de lipídios, podendo este variar de acordo com a composição química do meio e/ou estratégia de cultivo.

Tabela 4 – Teor de lipídios de algumas espécies de microalgas dulcícolas sob diferentes condições de cultivos

Microalgas	Condições de Cultivo	Teor de Lipídios (%)	Fonte
<i>Chlorella vulgaris</i>	Fotoautotrófico	22,94 – 27,38	Heredia-Arroyo <i>et al.</i> (2011)
	Mixotrófico	9,91 – 13,82	
	Heterotrófico	26,50 – 30,58	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mixotrófico	13 – 27	Cabanelas <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico	47,0 - 50,6	Feng <i>et al.</i> (2014)
<i>Botryococcus braunii</i>	Fotoautotrófico	9,30	Choi;Yu (2015)
	Mixotrófico	16,41	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Fotoautotrófico	12,20	Choi;Yu (2015)
	Mixotrófico	15,91	
<i>Scenedesmus</i> sp.	Fotoautotrófico	13,11	Choi ;Yu (2015)
	Mixotrófico	16,24	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Fotoautotrófico	4 – 33	Paranjape <i>et al.</i> (2016)
	Mixotrófico	25 – 35	

O conhecimento a cerca da composição do óleo microalgal é de grande importância, uma vez que, a composição de ácidos graxos desempenha papel importante na

qualidade do biodiesel. Deste modo, caracterizar lipídios microalgais se torna essencial para garantir que o biodiesel estará em acordo com as especificações exigidas pelas agências regulatórias. No Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) exige que o biodiesel atenda a especificação do Regulamento Técnico nº 3/2014, parte integrante da Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014 (ANP, 2014).

A produção de óleo de biomassas vegetais e de microalgas nos últimos anos, encontram-se listados na Tabela 5. Os resultados apresentados nesta tabela permitem observar que a produção de óleo microalgal é superior comparado as culturas oleaginosas como o girassol, cujas sementes podem conter cerca de 40% de óleo (STANISLAV; CHISTINA, 2016; SUGANYA *et al.*, 2016; SHUBA; KIFLE, 2018; ISA; GANDA, 2018; ELRAYIES, 2018).

Tabela 5 – Potencial de produção de óleo oriundo de matérias-primas vegetais e microalgas

Matéria-prima	Produção de óleo (L ha⁻¹)	Fonte
Soja	446	Isa; Ganda (2018);
	56-636	Shuba; Kifle (2018) e Gonzalez-Fernandez; Muñoz (2017)
Óleo de palma	1892	Shuba; Kifle (2018)
	5950	Isa; Ganda (2018)
	3.226-6.000	Gonzalez-Fernandez; Muñoz (2017)
Girassol	98-1.070	Gonzalez-Fernandez; Muñoz (2017)
	779	Isa; Ganda (2018)
	952	Shuba; Kifle (2018)
Colza	1.190	Shuba; Kifle (2018);
	538-974.	Isa; Ganda (2018) e Gonzalez-Fernandez; Muñoz (2017)
Microalgas	100.000	Isa; Ganda (2018)
	98.500	Shuba; Kifle 2018
	136.900	Gonzalez-Fernandez; Muñoz (2017)

3.3.2 Bioetanol a partir de microalgas

O bioetanol é o biocombustível mais comercializado no mundo devido a seus baixos custos de produção (ZABED *et al.*, 2017). Os Estados Unidos e o Brasil são os principais produtores em todo o mundo, utilizando o milho e cana-de-açúcar como principal matéria-prima, respectivamente (JAMBO *et al.*, 2016). No entanto, o uso destas matérias-primas prejudica o fornecimento de recursos alimentares, o que pode elevar os preços dos alimentos provocando uma crise neste setor (HO *et al.*, 2014; SHUBA; KIFLE, 2018).

Nos últimos anos, o bioetanol obtido através da biomassa microalgal tem se destacado por se constituir em uma tecnologia mais promissora, a qual se deve, principalmente, a obtenção de uma maior produtividade quando comparadas as matérias-primas de caráter alimentício e lignocelulósico (Tabela 6) (JAMBO *et al.*, 2016; SIRAJUNNISA; SURENTHIRAN, 2016; SHUBA; KIFLE, 2018). A Tabela 6 apresenta o quanto a produtividade de bioetanol microalgal pode ser superior quando comparado as principais matérias-primas utilizadas atualmente para a produção do etanol comercializado.

Tabela 6 – Produtividade obtida em bioetanol a partir de diferentes matérias-primas

Matéria-prima	Produtividade em bioetanol (L ha⁻¹ a⁻¹)
Trigo	1.560
Mandioca	6.000
Grãos de Milho	3.571
Beterraba sacarina	5.000
Cana-de-açúcar	5.882
Microalga	24.355-136.886

Fonte: SIRAJUNNISA; SURENTHIRAN, 2016.

De acordo com Shuba; Kifle (2018) embora a maioria das espécies de microalgas apresentem baixos conteúdos de carboidratos, esta é uma condição que pode ser revertida, pois, estas podem possuir ou ser induzidas a produzirem maiores concentrações de carboidratos. Segundo Salam; Velasquez-orta; Harvey (2016) e JAMBO *et al.* (2016), espécies de microalgas pertencentes aos gêneros como *Chlorococcum*, *Scenedesmus*,

Chlorella e *Chlamydomonas* têm a capacidade de produzir elevados níveis de carboidratos como polímeros de reserva. Os carboidratos das microalgas podem ser encontrados na parede celular em camadas externas e internas, assim como no seu interior, como material de reserva na forma de amido. Nas paredes externas podem ser encontrados polissacarídeos como a pectina, ágar e alginato, já nas paredes internas, celulose e hemicelulose (GONZALEZ-FERNANDEZ; MUÑOZ, 2017; CHEN *et al.*, 2013; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

3.4 Situação atual dos biocombustíveis de terceira geração e perspectivas futuras

Apesar dos avanços nas pesquisas, a tecnologia para produção de biocombustíveis a partir de microalgas ainda não atingiu viabilidade comercial no Brasil ou no mundo. Brasil; Silva; Siqueira (2017) reportam que ainda não é possível produzir o biocombustível de microalgas em larga escala, e que a expectativa que isto venha ocorrer é a partir do final da próxima década. Vários autores (RASLAVIČIUS; STRIUGAS; FELNERIS, 2018; CALIXTO *et al.*, 2018) mencionam que uma das principais problemáticas diz respeito as técnicas atuais de cultivo microalgal que ainda não se constituem em uma alternativa viável para o fornecimento de energia, uma vez que o preço final do biocombustível formado é dependente dos custos das etapas de cultivo e produção.

Segundo Klein *et al.* (2018) ainda são necessárias mais pesquisas para a viabilidade econômica do uso de biocombustíveis microalgais, pois o uso de tecnologias convencionais de produção desses organismos envolvem altos investimentos e resultam em elevados custos de produção dos biocombustíveis.

De acordo com Carneiro *et al.* (2017) há indicativos de que resultados mais satisfatórios podem ser alcançados para produção de biocombustíveis microalgais ao se utilizar espécies selecionadas que sejam mais resistentes e produtivas e ainda, otimizando as condições de cultivo, desenvolvendo sistemas de colheita inovadores e adotando processos que necessitem de menor intensidade de energia para conversão da biomassa.

Vários estudos corroboram que há a possibilidade de índices mais satisfatórios de balanços econômicos e energéticos da produção microalgal e mencionam a necessidade de se investir cientificamente na busca de soluções (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016; MILANO *et al.*, 2016; ELRAYIES, 2018; RASLAVIČIUS; STRIUGAS; FELNERIS, 2018; SHUBA; KIFLE, 2018; KLEIN *et al.*, 2018).

A seguir encontra-se a Tabela 7 com dados de projeções envolvendo custo de produção e preço mínimo de venda de alguns produtos provenientes de microalgas.

Tabela 7 – Preços mínimos de venda e custos de produtos derivados de microalgas

Produtos	Método de obtenção	Tipo de reator	Preço mínimo dos produtos (US\$/gal)	Referências
Diesel verde	Hidrotratamento	Tanques abertos e fotobioreatores	9,82–16,95 ^a	Delrue <i>et al.</i> (2012)
Biodiesel	Transesterificação	Tanques abertos	6,28–9,87 ^a	
Biodiesel	Extração de óleo e transesterificação com metanol	Tanques abertos	1,60–3,72 ^b	Nagarajan <i>et al.</i> (2013)
Lipídios	Extração com hexano	Tanques abertos com forro de plástico	21,11 ^a	Ramos <i>et al.</i> (2014)
Lipídios	Extração	Tanques abertos	12,33 ^a	Richardson; Johnson (2014)
Biodiesel bruto	Extração de solvente + Hidrotratamento	Tanques abertos	109,12 ^b	Richardson <i>et al.</i> , (2014)
Biodiesel bruto	Extração de solvente	Fotobioreatores fechados	76,98 ^a	

^aPreço mínimo de venda. ^bCusto de produção.

O alcance dos melhores rendimentos de biomassa e dos compostos energéticos é sem dúvida o objetivo mais promissor para que os biocombustíveis microalgais sejam qualificados como os mais sustentáveis e eficientes. De acordo com os autores Gonzalez-Fernandez; Muñoz (2017) para que o biodiesel proveniente de microalgas entre no já competitivo mercado, seja como um complemento ou até mesmo como um substituto ideal do diesel fóssil, é necessário que o mesmo apresente propriedades químicas e físicas satisfatórias e que siga os padrões já adotados para os demais que já estão sendo comercializados.

Shuba; Kifle (2018) reportam que apesar de existirem muitas dificuldades na comercialização dos biocombustíveis de microalgas, acredita-se que as recompensas acabariam superando os riscos. Estes autores reportam que os investimentos em microalgas atingiram mais de US\$ 900 milhões em todo o mundo, todavia que tais dados precisam ser atualizados, visto que a todo o momento mais publicações estão sendo disponibilizadas, atraindo um número maior de pesquisadores e investidores.

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolve programas para produção de biocombustíveis e bioprodutos por meio da caracterização de recursos genéticos de microalgas continentais e o estabelecimento de um programa de melhoramento a longo prazo. Neste contexto, a Petróleo Brasileiro S.A (PETROBRAS), uma das maiores empresa de petróleo e gás, estuda microalgas marinhas para produção de biodiesel, tendo como objetivo a integração da produção de microalgas na indústria do petróleo (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017).

Neste sentido, nos últimos anos tem-se observado que os processos de produção de biocombustíveis a partir de microalgas avançaram significativamente (LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017; CALIXTO *et al.*, 2018) e que este cenário vem sendo estimulado por vários projetos de pesquisa científicas e implantação da indústria proporcionando cada vez mais melhorias no processo. No entanto, ainda se faz necessário minimizar ou solucionar os gargalos que impedem a comercialização e a produção econômica de microalgas, para um valor relativamente baixo nos mercados de energia e combustíveis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades relativas às fases experimentais deste estudo encontram-se divididas em duas etapas: a primeira abordando a coleta, isolamento, identificação e caracterização química microalgal; e, enquanto a segunda envolveu a otimização dos cultivos e a caracterização dos ácidos graxos, conforme apresentadas nos fluxogramas a seguir (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Fluxograma das atividades desenvolvidas na primeira etapa do estudo de microalgas com potencial para produção de bioetanol e biodiesel

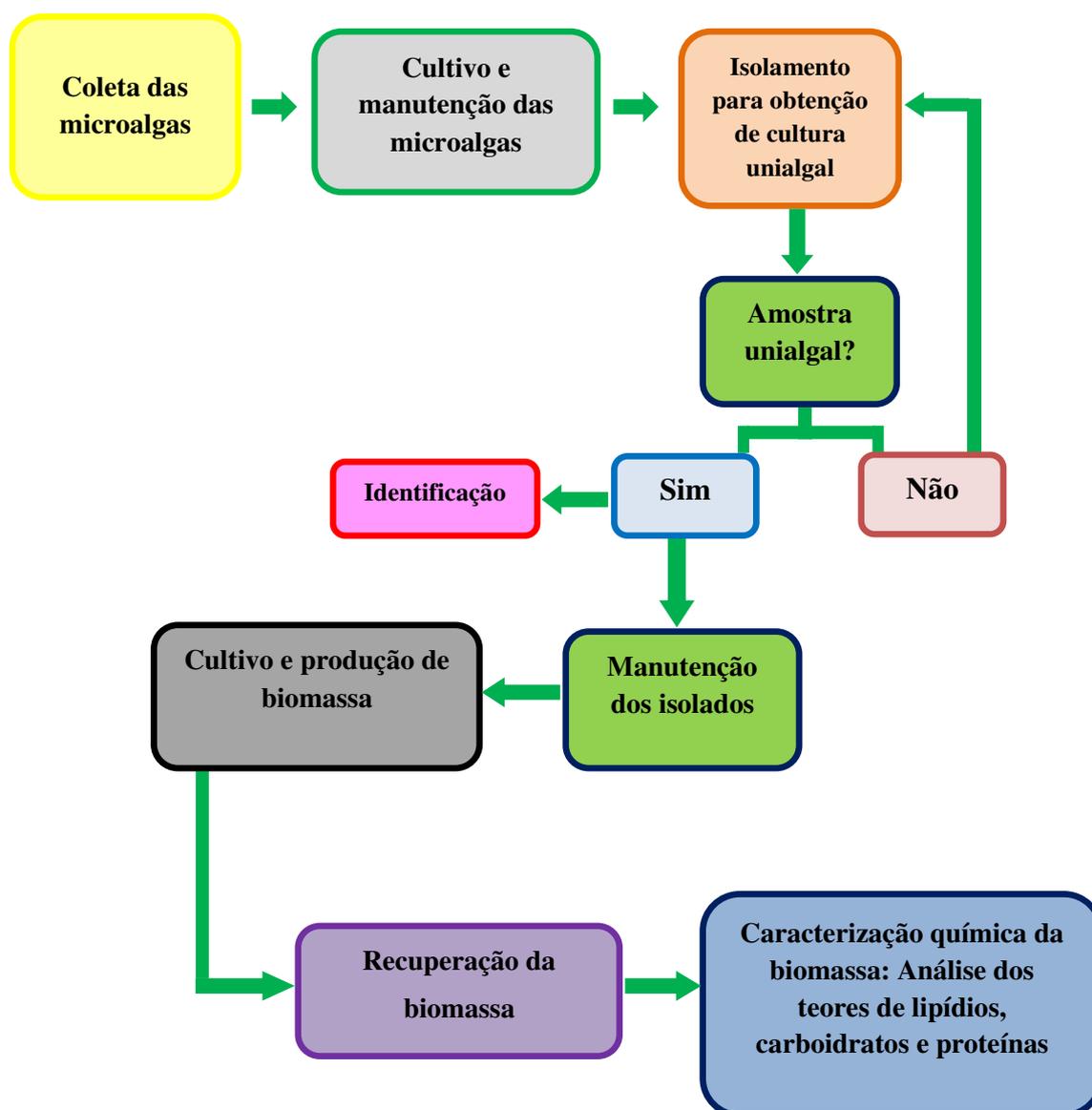


Figura 3 – Fluxograma das atividades desenvolvidas na segunda etapa do estudo de microalgas com potencial para produção de bioetanol e biodiesel



4.1 Primeira etapa

4.1.1 Coleta, isolamento e identificação de microalgas

As coletas das microalgas estudadas foram realizadas em dois locais: **1.** rio Pinheiro no distrito de Sopa (18°12'48.0"S 43°42'59.2"W), município de Diamantina-MG e **2.** no tanque de peixes do departamento de Zootecnia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM (18°12'09.3"S; 43°34'25.9"W) localizado em Diamantina-MG. A amostragem foi realizada com auxílio de tubos Falcon de 50 mL, os quais foram acondicionados em caixa de isopor e transportados cuidadosamente (sem choques de temperatura e luz) para o laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis (LabMBio) para posterior isolamento e cultivo.

As amostras coletadas foram centrifugadas em tubos Falcon de 15 mL (Centrífuga Centribio®) a 1344 RCF (Força Centrífuga Relativa) por 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células sedimentadas inoculadas em nove (09) diferentes meios de cultura, contidas em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, todos descritos na literatura como específicos para microalgas dulcícolas. Os meios empregados, Bold's Basal Medium (BBM), L.C Oligo (LC), CHU, ASM1, Meio Closterium (MC), BG-11 e Carefoot (CA), foram elaborados conforme ABNT-NBR 12648 (2004) e Andersen (2005). Além dos meios já mencionados, também foram utilizados os meios LC e CHU modificados pela adição de solução de metais traços, nomeados de CHU_{MT} e LC_{MT} (Tabela 8).

As culturas microalgais contidas em tubos de ensaio com tampas rosqueadas foram incubadas em câmara de fotoperíodo (NEW LAB®) à 25°C, em regime claro : escuro de 12 : 12 horas, a fim de aclimatar e adensar a biomassa microalgal. Concomitante ao período de incubação, procedeu-se o isolamento que foi realizado com o auxílio de um capilar, confeccionado com pipeta tipo Pasteur de vidro. Para tanto, uma alíquota de 10 microlitros da amostra contendo a(s) microalga(s) de interesse foram adicionadas em lâmina de vidro de microscopia e, a partir desta, com auxílio de um capilar, procedeu-se a coleta. A fim de obter uma cultura pura, a alíquota coletada foi transferida para uma nova lâmina de vidro contendo três gotas de água destilada estéril, seguida de observação ao microscópio (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). Esse procedimento foi repetido por sucessivas vezes até a obtenção da cultura unialgal.

Tabela 8 – Composição dos meios de cultivo utilizados para o crescimento das microalgas dulcícolas isoladas

Meio	Nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Meio	Nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)	Meio	Nutriente	Concentração (mg L ⁻¹)
LC	(CaNO ₃) ₂ .4H ₂ O	40	ASMI	NaNO ₃ / NH ₄ Cl ₂	170	CAREFOOT	NaNO ₃	250
	KNO ₃	100		MgCl ₂ .6H ₂ O	41		K ₂ HPO ₄	9,7
	MgSO ₄ .7H ₂ O	30		MgSO ₄ .7H ₂ O	49		KH ₂ PO ₄	22,7
	K ₂ HPO ₄	40		CaCl ₂ .2H ₂ O	29		MgSO ₄	4,97
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,015		KH ₂ PO ₄	34,8		CaCl ₂	9,9
	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O	0,03		Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	53,2		NaCl	16,5
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03		H ₃ BO ₃	4,96		Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	7,56
	CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,03		MnCl ₂ .4H ₂ O	2,78		FeCl ₂	0,97
	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,019		FeCl ₃ .6H ₂ O	2,16		MnCl ₂	0,18
	H ₃ BO ₃	0,03		ZnCl ₂	0,67		ZnCl ₂	0,05
	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	0,81		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,038		Na ₂ .MoO ₄	0,065
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,31		CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0028		CaCl ₂ .6H ₂ O	1,82
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,31		Na ₂ .EDTA	14,8			
	NaHCO ₃	7,5						
BBM	NaNO ₃	250	CHU	NaNO ₃	250	BG-11	Citrato de Ferro III	2
	CaCl ₂ .2H ₂ O	15		CaCl ₂ .2H ₂ O	15		Ácido cítrico	6
	MgSO ₄ .7H ₂ O	75		MgSO ₄ .7H ₂ O	75		NaNO ₃	150
	K ₂ HPO ₄	75		K ₂ HPO ₄	75		Citrato de amônio	6
	KH ₂ PO ₄	175		KH ₂ PO ₄	175		K ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	400
	NaCl	25		NaCl	25		MgSO ₄ .7 H ₂ O	750
	KOH	25		KOH	25		CaCl ₂ .2 H ₂ O	360
	EDTA	500		EDTA	500		NaH ₂ CO ₃	200
	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98		FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98		Na ₂ .EDTA.H ₂ O	1
	H ₂ SO ₄	1000µL		H ₂ SO ₄	1000µL		CuSO ₄ .5H ₂ O	2
	H ₃ BO ₃	0,01142		H ₃ BO ₃	11,42		ZnSO ₄ .7H ₂ O	6
	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,00071		ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,0882		CoCl ₂ .6H ₂ O	6
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,0144	MnCl ₂ . 4H ₂ O	40			

				Continuação...		
	MoO ₃	0,71	MoO ₃	0,0071	MnO ₃	40
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	1,57	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,0157		
	Co(NO ₃). 6H ₂ O	0,49	Co(NO ₃). 6H ₂ O	0,0049		
Meio C.	Tris base	500	NaNO ₃	250	(CaNO ₃) ₂ .4H ₂ O	40
	KNO ₃	100	CaCl ₂ .2H ₂ O	15	KNO ₃	100
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	150	MgSO ₄ .7H ₂ O	75	MgSO ₄ .7H ₂ O	30
	Na ₂ EDTA	1000	K ₂ HPO ₄	75	K ₂ HPO ₄	40
	FeCl ₂ .6H ₂ O	194	KH ₂ PO ₄	175	CuSO ₄ .5 H ₂ O	10,015
	ZnCl ₂	10,4	NaCl	25	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O	0,03
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,6	KOH	25	ZnSO ₄ .7H ₂ O	220,03
	CoCl ₂ .6H ₂ O	4,04	EDTA	50	CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,03
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	36	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,019
	Tiamina	100	H ₂ SO ₄	1000μL	H ₃ BO ₃	1000,03
	Biotina	0,5	H ₃ BO ₃	1011,42	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	0,81
	Cianocobalamina	0,5	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	22,0882	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,31
			MnCl ₂ . 4H ₂ O	180,0144	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,31
			MoO ₃	0,0071	NaHCO ₃	7,5
		CuSO ₄ .5 H ₂ O	10,0157	MnO ₃	6	
		CoCl ₂ .6H ₂ O	10	CoCl ₂ .6H ₂ O	10	
		MnO ₃	6	MnCl ₂ . 4H ₂ O	180	
		Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4360	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4360	
		FeCl ₃ .6H ₂ O	3150	FeCl ₃ .6H ₂ O	3150	

Fonte: ABNT-NBR 12648, 2004 e ANDERSEN, 2005. EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

Os morfotipos coletados foram inoculados em meio líquido, contido em tubo de ensaio de tampa rosqueada de 10 mL e em meio sólido, contidos em placa de Petri. Os meios utilizados para o isolamento foram os descritos anteriormente, sendo os sólidos adicionados de ágar. Após a constatação do crescimento das culturas, com o intuito de garantir colônias unialgais, estas foram novamente cultivadas nos mesmos meios líquidos nas condições de incubação já descritas. A viabilidade da cultura isolada foi monitorada diariamente por meio de observações microscópicas e a manutenção desta realizada a cada sete dias pela adição de meio líquido seguindo as condições de cultivo como mencionadas.

A identificação microscópica das microalgas a nível de gênero foi realizada com base em suas características morfológicas, de acordo com os estudos e chaves taxonômicas de Guiry; Guiry (2017); Komárek; Marvan (1992); Bicudo; Menezes (2006); Fanés *et al.* (2009) e, Komárek; Anagnostidis (1999).

4.1.2 *Produção de biomassa unialgal*

Os isolados identificados foram cultivados em maior escala visando alcançar a produção de biomassa unialgal necessária para a caracterização química. O processo foi operado em batelada alimentada, utilizando fotobiorreatores não instrumentados, transparentes e descartáveis com capacidade de 5 Litros de volume útil. Os fotobiorreatores foram submetidos a desinfecção química utilizando solução de metabissulfito 6% mantidos por 24 horas de repouso e, então, enxaguados com água destilada abundante a fim de assegurar a completa eliminação do reagente.

A produção de biomassa microalgal foi realizada em fotobiorreatores a partir da adição de 900 mL do meio de cultivo, seguidos de 100 mL da cultura autenticada como unialgal. Esse procedimento foi realizado para os nove meios de cultivo apresentados acima perfazendo um total de nove experimentos. Os inóculos realizados corresponderam a 10% do volume do meio adicionado. Todos os cultivos foram incubados em câmara de fotoperíodo (NEW LAB®) a 25°C, sob agitação e aeração constantes com o uso de bombas de ar (BIG AIR® A470/5W). Com a finalidade de garantir uma melhor purificação do ar nos fotobiorreatores, foram utilizados pequenos filtros contendo algodão hidrofóbico esterilizados em autoclave para evitar contaminação de culturas não desejadas, bem como reter impurezas.

4.1.3 *Recuperação da biomassa unialgal*

A biomassa unialgal oriunda do cultivo nos diferentes meios de crescimento foi recuperada por centrifugação em tubos Falcon de 15 mL (Centrífuga Centribio®) a 1344 RCF (Força Centrífuga Relativa) por 10 minutos. O sobrenadante oriundo da centrifugação, foi descartado e o precipitado ressuscitado em água destilada, seguido de nova centrifugação na mesmas condições. O procedimento foi repetido até que todo o volume da cultura fosse centrifugado. Logo após ao processo de centrifugação, a massa úmida obtida foi transferida para placas de Petri (previamente desumidificadas a 105°C) seguidas de pesagem e incubação a 60°C em estufa (SPLabor®) até atingir peso constante. Após esta etapa, procedeu-se a pesagem das amostras contidas em placa de Petri para fins da determinação da biomassa microalgal.

Os resultados da produção de biomassa (B_x) foram calculados pela Equação 1 descrita a seguir e expressos em $g L^{-1}$. Os resultados da produtividade de biomassa (P_x) foram calculados pela Equação 2 e expressos em miligrama por litro por dia ($mg L^{-1} dia^{-1}$).

$$B_x = \frac{P_f(g) - P_i(g)}{V_f} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

B_x = Produção de biomassa ($g L^{-1}$)

P_f = Peso final da placa de Petri (g)

P_i = Peso inicial da placa de Petri (g)

V_f = Volume final de cultivo centrifugado (L)

$$P_x = \frac{B_x}{T_f} \quad \text{Equação 2}$$

onde:

P_x = Produtividade volumétrica de biomassa ($mg L^{-1} dia^{-1}$)

B_x = Produção de biomassa ($mg L^{-1}$)

T_f = Tempo final de cultivo (dias)

A biomassa microalgal recuperada e desidratada foi macerada com auxílio de pistilo e almofariz, obtendo-se um pó fino sem a presença de grânulos, o qual foi analisado quanto a sua composição química (lipídios, amido, açúcares solúveis totais (AST), carboidratos totais e proteínas).

4.1.4 Avaliação do crescimento celular microalgal em cultivo fotoautotrófico

O crescimento unialgal foi monitorado a cada 24 horas por leitura de densidade óptica (D.O) em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®) a 570 nm (LOURENÇO, 2006) e por contagem celular direta em microscópio óptico (BEL Photonics) com o auxílio de câmara de Neubauer (ALVES; MORAES, 1998). A partir dos dados obtidos foram plotados gráficos mostrando o perfil de crescimento das microalgas nos nove meios de cultura com resultados expressos em $n^{\circ}_{\text{células mL}^{-1}}$ em função do tempo de crescimento.

O monitoramento do crescimento celular foi realizado a partir de cultivos feitos em fotobiorreatores com capacidade para 1,5 Litros contendo 1.350 mL de meio de cultura, conforme mencionados na Tabela 8 e 150 mL de inóculo da cultura unialgal (proveniente de cultivos nos meios já mencionados). Logo após o inóculo, procedeu-se a homogeneização e a retirada de 1 mL para leitura da D.O_{570nm} e 1 mL para a contagem celular. Na quantificação por D.O. a amostra foi submetida a centrifugação a 6160 RCF (força centrífuga relativa) por 10 minutos, seguida de descarte do sobrenadante e lavagem com água destilada. Esse procedimento foi repetido a cada 24 horas por um período de até 24 dias.

A contagem em câmara de Neubauer foi realizada a cada 24 horas pelo mesmo período, e os parâmetros de crescimento determinados foram a taxa específica de crescimento (μ_x) (Equação 3) e o tempo de geração (t_g) (Equação 4), tempo necessário para que as células possam se dividir (Schmidell *et al.*, 2001). O procedimento foi realizado em triplicata.

$$\mu_x = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{t - t_0}$$

Equação 3

μ_x : taxa específica de crescimento
 X : número de células
 X_0 : número de células inicial
 t : tempo (h)

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_x}$$

Equação 4

t_g : tempo de geração
 μ_x : taxa específica de crescimento

4.2 Segunda etapa

4.2.1 Seleção de microalga para otimização da produção de biomassa

A fim de selecionar entre a(s) microalga(s) obtida(s) a que apresentou as melhores características químicas quanto a produção de compostos de interesse procedeu-se a caracterização química conforme descrito a seguir. Após a caracterização química aquela que apresentou maior concentração de biomassa, lipídios e carboidratos, bem como menor concentração de proteínas, foi selecionada e, então, submetida a um processo de otimização a fim de obter melhores condições de produção destes com vistas para produção de biocombustíveis.

4.2.2 Caracterização química da biomassa unialgal

4.2.2.1 Determinação do teor de lipídios

A determinação de lipídios totais foi realizada segundo metodologia de Bligh e Dyer (1959). Os lipídios foram extraídos a partir de 50 mg da biomassa seca e macerada adicionados de solventes na seguinte ordem e quantidades: água (1,6 mL), metanol (4 mL) e clorofórmio (2 mL), seguido de homogeneização manual por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de clorofórmio e 2 mL de uma solução de 1,5% de sulfato de sódio (Na₂SO₄), homogeneizados por 2 minutos. A emulsão foi separada por meio de centrifugação a 1.344 RCF por 10 minutos. Após a centrifugação, foram obtidas três fases distintas: uma fase aquosa no topo do tubo, uma fase central representada por um disco de proteínas e, uma fase orgânica, no fundo do tubo contendo os lipídios. A fase orgânica foi transferida para uma placa de Petri, previamente desumidificada em estufa (SPLabor®), à 105°C, até atingir peso constante, seguida de incubação em estufa por aproximadamente 24 horas

para remoção do clorofórmio e obtenção da concentração da massa lipídica obtida. A massa da fração lipídica foi calculada conforme descrito na Equação 5 e o resultado expresso em % de lipídios.

$$\% \text{Lipídios} = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

P_i = massa seca inicial da amostra de microalgas (g).

P_f = massa seca da fração lipídica obtida (g).

A produtividade lipídica (L_x) foi determinada a partir da multiplicação dos valores da produtividade volumétrica de biomassa (P_x) pelo teor lipídios e expresso em $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$.

4.2.2.2 Determinação do teor de amido e açúcares solúveis totais

Os teores de açúcares solúveis totais (AST) e de amido foram determinados pela metodologia proposta por McCready *et al.* (1950). A extração dos AST e amido foi realizada a partir de 20 mg de amostra seca e macerada contida em microtubo do tipo Eppendorf® de 2 mL. Para a determinação do teor de AST a amostra foi adicionada de 1,5 mL de solução de etanol a 80%, seguida de homogeneização e incubação em banho-maria a 90°C por 15 minutos e, centrifugação a 6160 RCF por 10 minutos. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e em seguida, o sobrenadante foi recolhido e avolumado em balão volumétrico para 50 mL com água destilada. A dosagem de amido foi realizada a partir do precipitado da análise de AST o qual foi ressuspenso em 1,5 mL de solução de ácido perclórico a 30%, seguido de homogeneização e repouso por 30 minutos em bancada e, posterior centrifugação a 6160 RCF por 10 minutos. O processo foi repetido por mais duas vezes e a seguir o sobrenadante resultante foi recuperado e avolumado com água destilada em balão volumétrico de 25 mL para posterior dosagem de amido.

A dosagem do teor de amido e AST foram determinadas pelo método da antrona 0,1 g L⁻¹ em solução fria de ácido sulfúrico a 76%, utilizando curva analítica de D-glicose 0,1 g L⁻¹ como referência. A dosagem foi realizada a partir 1000 µL da solução de amido/AST contido em tubo de ensaio de 10 mL, seguido da adição de 5,0

mL da solução de antrona e incubação a 90°C por 10 minutos com posterior resfriamento em banho de água com gelo. Após este procedimento foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®) a 620 nm. A partir da equação da reta ($Abs = a.[glicose]$) foi calculado a quantidade de amido e açúcares solúveis totais utilizando a Equação 6. Os resultados foram expressos em % de amido e AST.

$$\% \text{ Amido e } \% \text{ AST} = \frac{\frac{M}{a} * V}{\frac{1000}{m}} * 100 \quad \text{Equação 6}$$

onde:

M = média da absorbância;

a = coeficiente angular da equação da reta;

V = volume de extrato (mL);

m = massa da amostra (g).

A produtividade de AST (AST_x) e amido (A_x) foram determinadas a partir da multiplicação dos valores obtidos de produtividade volumétrica de biomassa (P_x) pelo teor de AST e amido, respectivamente.

4.2.2.3 Análise de carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais (DUBOIS *et al.*, 1956) foi realizada a partir de 5 mg de amostra desidratada e macerada submetida à hidrólise alcalina com 2 mL de NaOH 1,0 N, à 100°C, em banho-maria durante 1 hora, seguida de resfriamento em temperatura ambiente. A seguir as amostras foram centrifugadas a 1344 RCF durante 10 min e, a partir do sobrenadante recuperado, foi realizada a quantificação de carboidratos totais.

A quantificação de carboidratos totais foi realizada a partir de 500 µL do sobrenadante que foram transferidos para um tubo de ensaio, seguidos da adição de 500 µL de fenol a 4% e repouso por 30 minutos. Logo após, foi adicionado 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado seguido de resfriamento a temperatura ambiente. Paralelamente foi preparada uma curva de calibração utilizando solução de glicose como padrão na concentração de 0,3 g L⁻¹. As amostras foram lidas em espectrofotômetro

(BIOSPECTRO SP22®) a absorvância de 480 nm e os resultados expressos em % de carboidratos totais.

A produtividade de carboidratos totais (C_x) foi determinada multiplicando-se a produtividade volumétrica de biomassa (P_x) pelo teor de carboidratos totais obtidos.

4.2.2.4 Análise de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do biureto (GORNALL; BORDAWILL; DAVID, 1949). A análise foi realizada a partir de 5 mg de amostra microalgal desidratada e macerada submetida à hidrólise alcalina com 2 mL de NaOH 1,0 N a 100°C em banho-maria durante uma hora, seguida de resfriamento em temperatura ambiente. A seguir as amostras foram centrifugadas a 1344 RCF durante 10 min e a partir do sobrenadante recuperado, realizada a quantificação de proteínas.

A quantificação foi realizada pela adição de 4 mL do reagente de biureto ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,15% p/v; tartarato duplo de sódio e potássio 0,60% p/v; KI 1,00% p/v em NaOH 1,00 mol L⁻¹) a 1 mL do sobrenadante contido em tubo de ensaio de 10 mL, seguido de repouso por 30 minutos na ausência de luz. Paralelamente foi preparada uma curva de calibração utilizando solução de albumina bovina como padrão na concentração de 2 g L⁻¹. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®) a absorvância de 540 nm e os resultados expressos em % de proteínas.

A produtividade volumétrica de proteínas totais (P_{tx}) foi determinada pela multiplicação do valor da produtividade volumétrica de biomassa (P_x) pelo teor de proteínas totais obtido.

4.2.3 Avaliação das condições de crescimento da microalga selecionada

4.2.3.1 Cultivo em batelada simples

A microalga selecionada foi cultivada no meio de cultura em que apresentou os melhores resultados de produção de biomassa, bem como de compostos de interesse para produção de biocombustíveis.

Devido a necessidade de se obter quantidades suficientes de biomassa para um inóculo inicial de aproximadamente 1 g L⁻¹, a cultura foi previamente cultivada sob condições fotoautotróficas no meio de cultura onde apresentou melhor produção. A partir deste cultivo a biomassa úmida foi recuperada por centrifugação, e então,

ressuspensa em um litro de meio de cultivo contido no fotobiorreator de vidro, nas condições descritas a seguir.

a) Fotoautotróficas/Controle – Cultivo iluminado sob fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro), em meio elaborado com $0,250 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de sódio (Tabela 8) sem adição de glicerina;

b) Mixotrófica – Cultivo iluminado sob fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro), em meio elaborado com adição de $1,366 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de sódio e 23 g L^{-1} de glicerina (bi destilada P.A LS Chemicals®);

c) Heterotrófico - Cultivo na ausência de luminosidade pelo uso de papel de alumínio, em meio elaborado com adição de $1,366 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de sódio e 23 g L^{-1} de glicerina (bi destilada P.A LS Chemicals®).

Todos os cultivos foram realizados em triplicata, e incubados em câmara de fotoperíodo (NEW LAB®) a 25°C com aeração constante com o uso de bombas de ar (BIG AIR® A470/5W). Para garantir uma melhor purificação do ar nos galões, foram utilizados pequenos filtros contendo algodão hidrofóbico estéril para evitar contaminação.

A quantidade de glicerina (bi destilada P.A LS Chemicals®) empregada no presente estudo (23 g L^{-1}) foi escolhida com base em relatos descritos na literatura científica sobre cultivos de microalgas em condições mixotróficas e heterotróficas (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016a; LIN; WU, 2015; SKORUPSKAITE; MAKAREVICIENE; LEVISAUSKAS, 2015). As concentrações de NaNO_3 e glicerina selecionadas resultam em uma relação C/N inicial de 46, a qual foi fixada para todas as culturas realizadas em modo mixotrófico e heterotrófico. No presente estudo, também foram testadas concentrações de glicerina e de NaNO_3 que resultaram na metade e no dobro da concentração descrita acima, sendo de $11,5 \text{ g L}^{-1}$ e 46 g L^{-1} e, de $0,683 \text{ g L}^{-1}$ e $2,732 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

Os cultivos testados foram codificados conforme as condições descritas na Tabela 9, sendo o código apresentado informativo de: microalga (Alg); Concentração de glicerina (representação numérica); Condição de cultivo heterotrófico ou mixotrófico (Letra final, H ou M).

Tabela 9 - Concentrações de glicerina, nitrato de sódio e relação C/N dos cultivos da microalga selecionada em batelada simples

Condição do cultivo	Luminosidade	Codificação dos Cultivos	Concentração glicerina (g L ⁻¹)	Concentração de nitrato de sódio (g L ⁻¹)	Relação C/N
Fotoautotrófico	12:12 h (claro:escuro)	Alg0	0,0	0,250	-
Mixotrófico	12:12 h (claro:escuro)	Alg11,5M	11,5	0,683g	46
Heterotrófico	Ausente	Alg11,5H	11,5	0,683g	46
Mixotrófico	12:12 h (claro:escuro)	Alg23M	23,0	1,366	46
Heterotrófico	Ausente	Alg23H	23,0	1,366	46
Mixotrófico	12:12 h (claro:escuro)	Alg46M	46,0	2,732	46
Heterotrófico	Ausente	Alg46H	46,0	2,732	46

4.2.3.2 Cultivo em batelada alimentada

A microalga selecionada foi cultivada utilizando uma segunda estratégia, em que a fonte de nitrogênio (NaNO₃) foi adicionada durante o processo de cultivo de forma intermitente, quando observada a redução de 50% da quantidade inicialmente ofertada.

As quantidades de NaNO₃ adicionadas foram calculadas a partir dos resultados obtidos provenientes das medidas de nitrato, conforme ensaios descritos no item 4.2.6, monitoradas diariamente.

Os cultivos foram realizados da mesma forma como descritos no item 4.2.3.1, ou seja, com relação C/N inicial de 46 fixada para todas as culturas realizadas em modo mixotrófico e heterotrófico, e as mesmas quantidades de glicerina e nitrato de sódio (Tabela 10). O bioprocesso foi conduzido em fotobiorreator de vidro contendo um litro de meio de cultivo, com inóculo inicial de 1 g L⁻¹ de biomassa úmida. Todos os cultivos foram realizados em triplicata e incubados em câmara de fotoperíodo (NEW LAB®) a 25°C com aeração constante com o uso de bombas de ar (BIG AIR® A470/5W), por um período de oito dias.

Os cultivos testados foram codificados conforme as condições descritas na Tabela 10, sendo o código apresentado informativo de: microalga (Alg); processo

conduzido em batelada alimentada (B); Concentração de glicerina (representação numérica); Condição de cultivo heterotrófico ou mixotrófico (Letra final, H ou M).

Tabela 10 – Concentrações iniciais de glicerina, nitrato de sódio e relação C/N dos cultivos da microalga selecionada em batelada alimentada

Condição do cultivo	Luminosidade	Codificação dos Cultivos	Concentração glicerina (g L ⁻¹)	Concentração de nitrato de sódio (g L ⁻¹)	Relação C/N
Fotoautotrófico	12:12 h (claro:escuro)	AlgB0	0,0	0,250	-
Mixotrófico	12:12 h (claro:escuro)	AlgB11,5M	11,5	0,683g	46
Heterotrófico	Ausente	AlgB11,5H	11,5	0,683g	46
Mixotrófico	12:12 h (claro:escuro)	AlgB23M	23,0	1,366	46
Heterotrófico	Ausente	AlgB23H	23,0	1,366	46
Mixotrófico	12:12 h (claro:escuro)	AlgB46M	46,0	2,732	46
Heterotrófico	Ausente	AlgB46H	46,0	2,732	46

4.2.4 Avaliação do crescimento celular dos cultivos

A partir do bioprocesso descrito no item 4.2.3.2, o crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas por leitura de densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®) com comprimento de onda de 630 nm (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016a) e por quantificação do peso seco da biomassa, expresso em gramas por litro (g L⁻¹). O monitoramento foi realizado a cada 24 horas por um período de oito dias.

A quantificação teve início logo após o inóculo a partir da retirada de 1 mL para leitura da D.O._{630nm} e 1 mL para a análise de peso seco. Para a mensuração das duas análises mencionadas as amostras coletadas foram submetidas a centrifugação a 6160 RCF por 10 minutos, seguida da retirada do sobrenadante e lavagem por ressuspensão em 1 mL de água destilada, por duas vezes. O sobrenadante retirado foi reservado para posteriores análises conforme descrito a seguir. Após esse procedimento, para determinação do peso seco, 1 mL da amostra ressuspensa foi transferida para uma placa de Petri, previamente desumidificada, seguida de incubação a 105°C em estufa até

atingir peso constante. Os procedimentos foram realizados em triplicata. Para quantificação por D.O., 1 mL da amostra resuspensa foi submetida a leitura direta em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®) a 630 nm. A partir dos dados obtidos foram plotados gráficos mostrando o perfil de crescimento das microalgas nas três diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio com resultados expressos em absorbância em função do tempo de crescimento.

A velocidade específica de crescimento utilizando os resultados de absorbância (μ_x) foi calculada de acordo com a Equação 7.

$$\mu_x = \frac{\ln N_2 - N_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Equação 7}$$

onde:

μ_x : velocidade específica de crescimento (h^{-1})

N_1 : absorbância no início da fase exponencial

N_2 absorbância no final da fase exponencial

t_1 : tempo no início da fase exponencial (h^{-1})

t_2 : tempo no final da fase exponencial (h^{-1})

4.2.5 *Quantificação de nitrato*

A quantificação de nitrato residual foi realizada a partir dos sobrenadantes resultantes dos bioprocessos mencionados nos itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2. A quantificação foi determinada através da reação colorimétrica desse íon com sulfato de brucina conforme metodologia proposta por Dos Santos, Pereira e Freire (2016). Para tanto, 1,0 mL de solução de sulfato de brucina a $0,6 \text{ g L}^{-1}$ em ácido sulfúrico 80% foram adicionados a uma alíquota de 0,25 mL contidos em microtubo tipo Eppendorf®, proveniente do sobrenadante da coleta realizada a cada 24 horas dos cultivos fotoautotrófico, mixo e heterotrófico.

A reação foi conduzida a 100°C por 15 minutos, sendo interrompida por resfriamento em banho de gelo. Os valores de absorbância foram lidos em um comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP22®), e convertidos para valores em g L^{-1} com o uso da curva de calibração utilizando nitrato de sódio como padrão nas concentrações de 0 a $0,05 \text{ g L}^{-1}$. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em $\text{g L}^{-1}_{\text{NaNO}_3}$.

4.2.6 Quantificação de glicerina

A quantificação de glicerina residual foi determinada a partir do sobrenadante coletado a cada 24 horas proveniente dos bioprocessos realizados para os cultivos mixotróficos e heterotróficos. A quantificação foi realizada através do método enzimático colorimétrico usando um kit para determinação de triglicerídeos da Laborclin®. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3 Análise dos ácidos graxos da microalga selecionada

Dentre as condições de cultivo citadas acima, a microalga selecionada, ou seja, a que apresentou maior produção de biomassa e concomitante, maior produção de lipídios, foi submetida a um novo cultivo a fim de obter a quantidade de biomassa desidratada suficiente para a extração do óleo para fins de caracterização dos ácidos graxos. O cultivo foi realizado de acordo como descrito no item 4.2.3.1, empregando as melhores condições (quantidade de glicerina e nitrato de sódio e condições de crescimento – fotoautotrófico, mixotrófico ou heterotrófico) que proporcionaram o melhor resultado.

O óleo extraído da biomassa de microalgas foi caracterizado quanto a composição de ácidos graxos. A extração foi realizada seguindo a metodologia descrita por Almeida *et al.* (2017) por meio de agitação utilizando agitador magnético (Nova Ética®). Para tanto, em um béquer contendo 1 g de biomassa desidratada da microalga selecionada procedeu-se a adição de 50 mL da mistura (1:1) clorofórmio:hexano seguido de homogeneização em agitador magnético por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o óleo bruto obtido foi filtrado em funil Buchner, para separação da biomassa residual. A fase orgânica foi submetida a secagem pela adição de sulfato de sódio anidro, seguida de nova filtração em funil Buchner. O excesso de solvente foi evaporado à temperatura ambiente, resultando no extrato lipídico.

A composição do óleo foi derivatizada, sendo analisada por cromatografia de fase gasosa com análise espectrométrica de massa (CG-EM Shimadzu), equipada com coluna do tipo Rtx-wax, com temperatura do injetor de 240°C. As condições de análise foram realizadas a temperatura inicial de 70°C por 3 minutos, com incremento de 10°C/min até 200°C por 5 minutos e a seguir, 10°C/min até 240°C onde permaneceu por 10 minutos. Todas as análises do perfil composicional descritas foram realizadas no

Laboratório Multiusuário do Pontal (LEMUP) Campus Pontal - Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

4.4 *Análise dos dados*

Os dados obtidos provenientes das análises conduzidas neste trabalho foram analisados através de análises de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias Tukey ao nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), utilizando o programa STATISTICA 7.0.

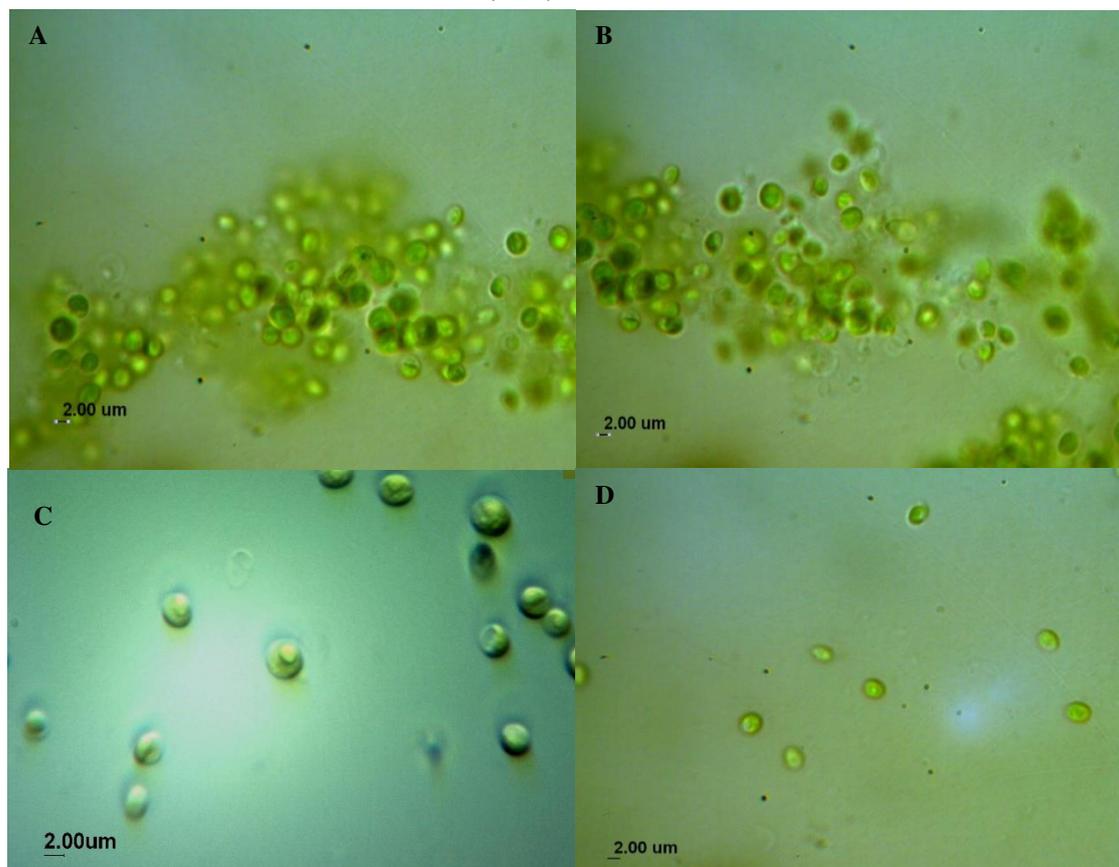
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeira etapa

A partir das coletas foram isoladas e identificadas morfologicamente três (03) microalgas em nível de gênero, sendo estas pertencentes aos seguintes gêneros: *Chlorella*, *Desmodesmus* e *Phormidium* ilustradas nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

A microalga *Chlorella* sp. pertencente a divisão Chlorophyta, classe Chlorophyceae e família Oocystaceae (BICUDO E MENEZES, 2006), apresentou células esféricas, solitárias e coloniais, contendo um núcleo e um pirenoide, nem sempre presente, além da ausência de flagelos. Embora a maioria dos autores reportem que as células de *Chlorella* sejam descritas como solitárias, as isoladas neste estudo, geralmente se apresentavam em aglomerados (Figura 4), este fato também foi observado por Matthews (2016) em seus estudos.

Figura 4 – Micrografias da microalga *Chlorella* sp. isolada do Rio Pinheiro, Distrito de Sopa (MG)



Chlorella sp. cultivo com 112 dias no meio BBM (NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , KOH , EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Foram observadas células esféricas com paredes lisas. A e B mostram células aglomeradas e C e D células solitárias. A, B e D, aumento de 100x em microscópio binocular Bel Photonics® e C, aumento de 100x em microscópio binocular Bioval®. Barra de escala = 2 µm Fonte: O próprio autor.

As células de *Chlorella* apresentaram entre 0,70-3,21 μm de diâmetro e 0,59-3,09 μm de comprimento. Entretanto, essas medidas são inferiores as mencionadas nos trabalhos de Mobin; Alam (2017) que afirmam que representantes do gênero *Chlorella* possuem de 2-10 μm de diâmetro.

De acordo com Bicudo; Menezes (2006) e Guiry e Guiry (2017) este gênero geralmente apresenta células esféricas, elipsoidais ou ovoides, mas, também podem ser assimétricas com parede celular bem distinta e delgada, pirenoide nem sempre presente e com cloroplastídio único na maioria das vezes, raramente, com ocorrência de dois. Estes autores reportam ainda, que os cloroplastídios quando únicos, tem a forma de taça (copo) e quando em número de dois, apresentam a forma de uma calota rasa e aberta.

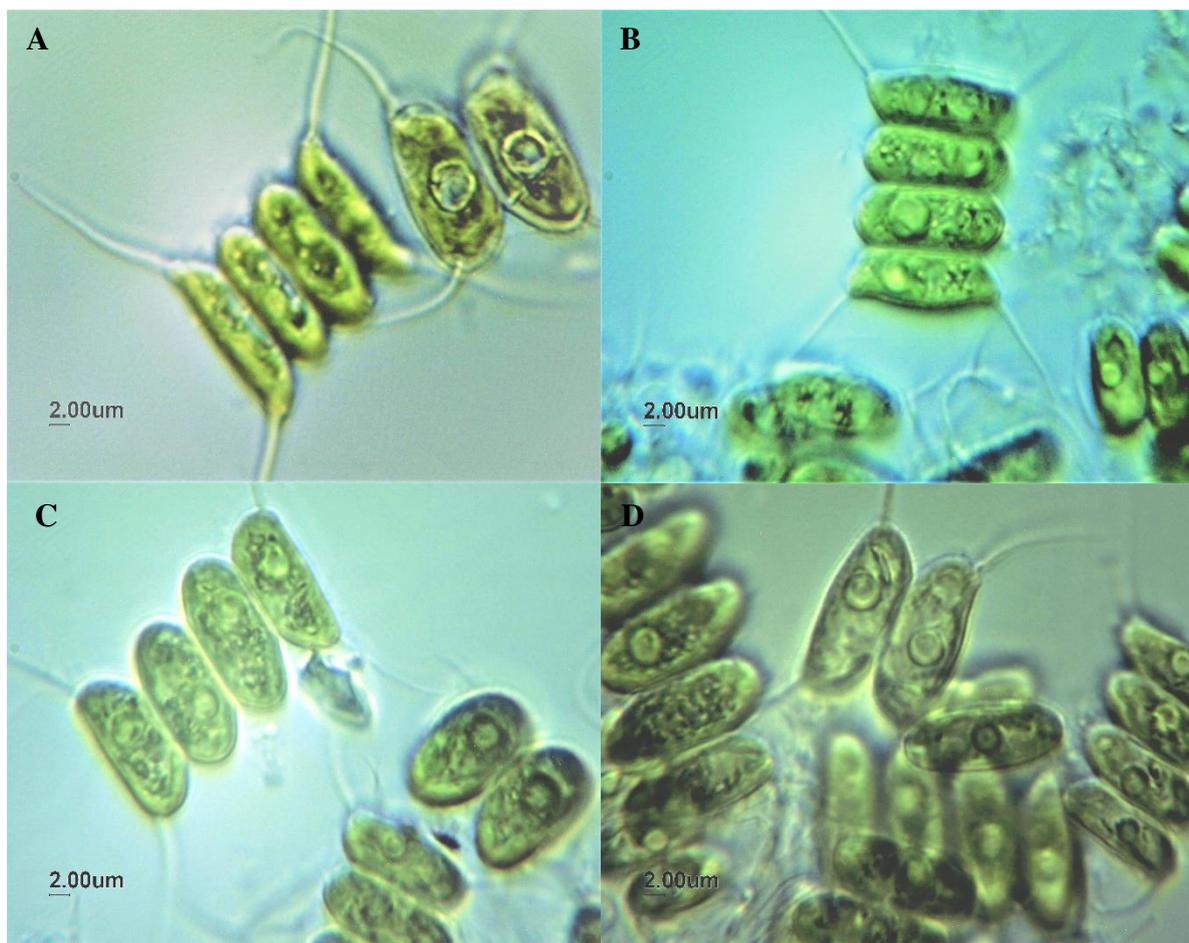
A microalga *Desmodesmus* sp., conhecida como antigo subgênero de *Scenedesmus* sp., também pertence à divisão Chlorophyta, classe Chlorophyceae e é membro da família Scenedesmaceae (BICUDO; MENEZES, 2006). Segundo Hentschke *et al.* (2010) e Guiry; Guiry (2017) as células de *Desmodesmus* sp. diferenciam-se de *Scenedesmus* sp. por apresentar uma quarta camada de esporolenina na parede celular, o que possibilita a formação dos espinhos e das demais ornamentações. O gênero *Desmodesmus* compreende a maioria das antigas espécies de *Scenedesmus* que possuem células ovais ou elípticas com espinhos ou dentes (MATTHEWS, 2016).

As microalgas deste gênero encontradas neste estudo, mediram de 2,90-8,24 μm de diâmetro e 5,44-17,79 μm de comprimento, com células solitárias e também agrupadas em colônias com 2, 4 e 6 células, dispostas lado a lado em uma só série, cada uma contendo um pirenoide e presença de espinhos nas extremidades, que mediam de 4,46-14,84 μm de comprimento. Essas características corroboram com a literatura, pois segundo Bicudo e Menezes (2006), Franceschini *et al.* (2009) e Guiry; Guiry (2017) o gênero reportado é descrito como um táxon que inclui indivíduos coloniais e de vida livre, sendo a colônia sempre plana e formada por 2, 4, 8 ou 16 células dispostas lado a lado, formando uma linha cujas células se dispõem numa só série, ou em duas alternantes, uma mais para cima e a outra mais para baixo. Estes autores reportam ainda que as células deste gênero podem ser elipsoides ou ovoides, podendo se apresentar iguais entre si ou de dois tipos e quando agrupadas, as células das extremidades se apresentam morfologicamente iguais diferindo das células internas. Neste estudo foi possível observar tais características nas células agrupadas (Figura 5).

Quanto a presença de espinhos, importante característica para descrição morfológica deste grupo, Franceschini *et al.* (2009) mencionam que na maioria das espécies

de *Desmodesmus* sp. ocorrem espinhos de comprimentos variados nos polos das células da extremidade da colônia e mais raramente inexistentes ou presentes em um ou ambos os polos das células internas da colônia.

Figura 5 – Micrografias da microalga *Desmodesmus* sp. isolada do tanque de peixes do departamento de Zootecnia da UFVJM

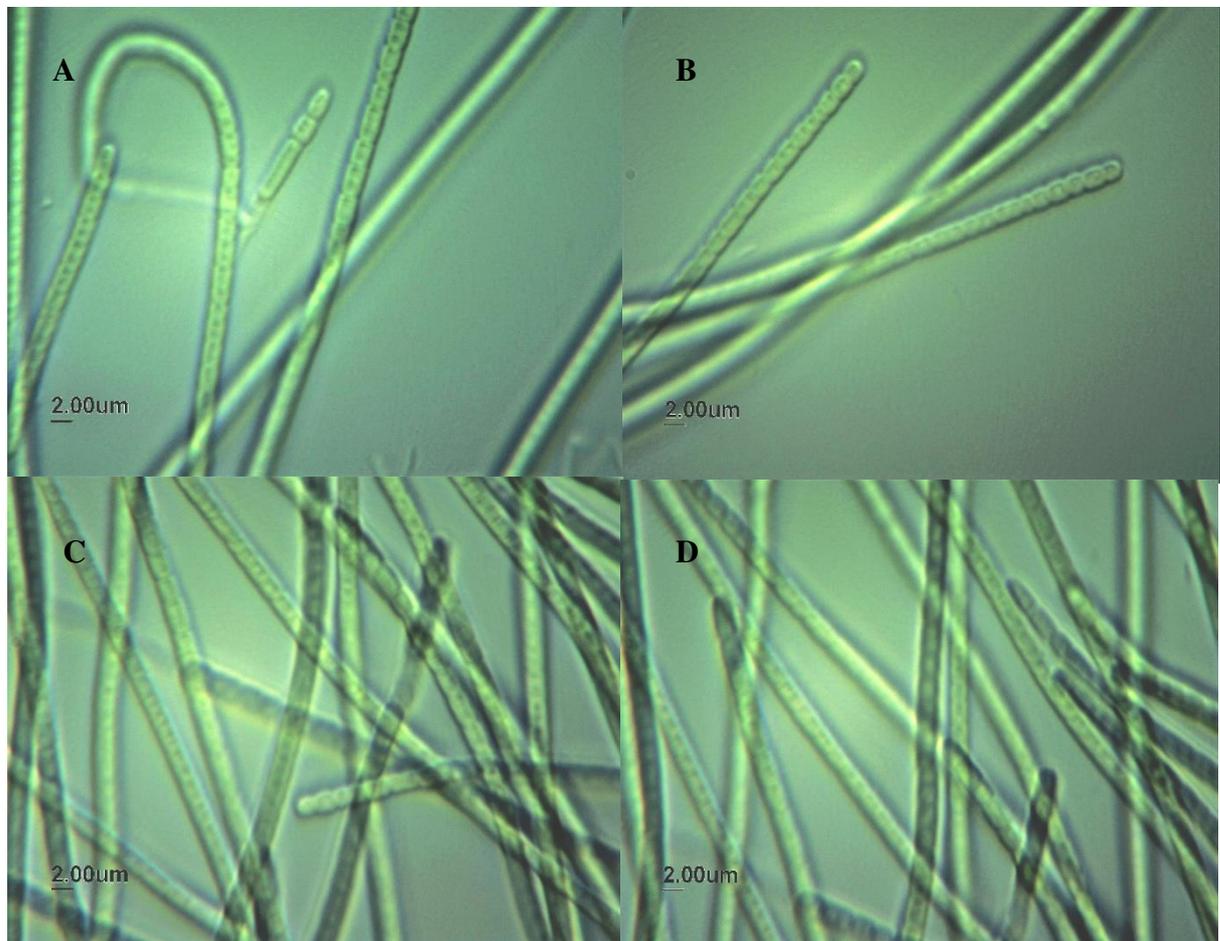


Desmodesmus sp., cultivo com 69 dias no meio CHU (NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , KOH , EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Foram observadas células de dois tipos, algumas iguais entre si e outras com as células da extremidade diferentes das internas e, em cada célula um cloroplastídeo. As células agrupadas em colônias planas de 2 e 4 células se apresentaram dispostas lado a lado. A, B e D mostram células com a presença de espinhos de comprimentos variados nos polos só das células extremas da colônia. C mostra células coloniais que se dispõem numa só série ou em duas alternantes, uma mais para cima e a outra mais para baixo. A, B, C e D, aumento de 100x microscópio binocular Bel Photonics®. Barra de escala: 2 μm . Fonte: O próprio autor.

A microalga *Phormidium* sp. é uma cianobactéria pertencente a divisão Cyanophyta, classe Cyanophyceae e família Phormidiaceae (BICUDO; MENEZES, 2006). As cianobactérias (Cyanophyceae), ou algas azuis, também são referenciadas como microalgas, termo que não possui valor taxonômico, porém são organismos com estrutura celular procariótica (BRASIL; BRUNALE, 2014; DEMIRBAS, 2010; DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). O gênero *Phormidium* sp. encontrado apresentou forma filamentosa, com filamentos retos e curvados, sem a ocorrência de qualquer tipo de ramificação. Alguns

filamentos se apresentaram isoladamente e outros formavam massas filamentosas emaranhadas de aspecto mucilaginoso (Figura 6) com coloração variando entre verde-escuro, verde-azulado. Nesse sentido, as características observadas neste estudo corroboram com as descritas por Bicudo; Menezes (2006) que mencionam que as células de *Phormidium* sp. são tipicamente isodiamétricas ou um pouco mais longas ou mais curtas do que largas e não exibem aerótopos, podendo apresentar bainha mucilaginosa, mas não há obrigatoriedade de sua ocorrência, visto que, muitas vezes, sua presença está associada a condições ambientais específicas.

Figura 6 – Micrografias da microalga *Phormidium* sp. isolada do Rio Pinheiro-Distrito de Sopa/MG



Phormidium sp., cultivo com 50 dias de no meio CHU (NaNO₃, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, K₂HPO₄, KH₂ PO₄, NaCl, NaCl, KOH, EDTA, FeSO₄.7H₂O, H₂SO₄, H₃BO₃, ZnSO₄.7 H₂O, MnCl₂. 4H₂O, MoO₃, CuSO₄.5 H₂O, Co(NO₃). 6H₂O). C e D apresentam a formação de massas de filamentos emaranhados. A e B mostram a estrutura do filamento, que pode ser reto ou curvado sem nenhum tipo de ramificação. A, B, C e D aumento de 100x microscópio binocular Bel Photonics®. Barra de escala: 2 µm. Fonte: O próprio autor.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados relacionados à produtividade volumétrica de biomassa, de amido, AST, carboidratos totais, lipídios e de proteínas da microalga *Chorella* sp. cultivada nos nove diferentes meios de cultivo avaliados. Os

resultados obtidos revelam que a *Chlorella* sp., quando cultivada em meio ASM1 em condição fotoautotrófica, apresentou a maior produtividade volumétrica de biomassa ($11,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) quando comparado aos demais meios utilizados neste estudo. Na literatura há registros e valores de produtividades superiores aos encontrados, todavia, em condições de cultivo diferentes das estudadas. Eloka-Eboka; Inambao (2017) estudando a espécie *Chlorella vulgaris*, em tanques abertos com agitação constante e iluminação de 12:12 horas, obtiveram rendimento de $35,31 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, sendo este em torno de três vezes superior ao obtido neste estudo. Luangpipat; Chisti (2017) cultivaram *Chlorella vulgaris* no meio BG-11 com adição de vitaminas e água do mar, e obtiveram uma produtividade volumétrica de biomassa igual a $68 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $73 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 11 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Chlorella* sp. em diferentes meios de cultivo

Meio de Cultivo	Px ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	Ax ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	ASTx ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	Cx ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	Lx ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	Ptx ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)
CHU	8,9	$2,8 \pm 0,0^b$	$0,8 \pm 0,0^d$	$2,8 \pm 0,0^a$	$1,9 \pm 0,0^a$	$1,4 \pm 0,0^c$
BBM	7,7	$2,3 \pm 0,0^c$	$0,8 \pm 0,0^d$	$2,3 \pm 0,1^b$	$1,0 \pm 0,0^d$	$3,2 \pm 0,1^c$
LC	3,1	$0,5 \pm 0,0^f$	$0,2 \pm 0,0^f$	$0,4 \pm 0,0^d$	$0,2 \pm 0,0^g$	$1,3 \pm 0,0^e$
CHU _{MT}	9,3	$1,8 \pm 0,0^d$	$2,6 \pm 0,0^a$	$2,8 \pm 0,1^a$	$0,7 \pm 0,0^e$	$3,9 \pm 0,1^b$
LC _{MT}	8,1	$3,0 \pm 0,0^a$	$1,3 \pm 0,0^b$	$2,4 \pm 0,0^b$	$1,3 \pm 0,0^c$	$2,0 \pm 0,0^d$
ASM1	11,7	$1,1 \pm 0,0^e$	$1,0 \pm 0,0^c$	$2,4 \pm 0,1^b$	$1,5 \pm 0,0^b$	$5,1 \pm 0,1^a$
BG-11	5,6	$0,3 \pm 0,0^{fg}$	$0,3 \pm 0,0^e$	$0,7 \pm 0,0^c$	$0,5 \pm 0,0^f$	$2,0 \pm 0,0^d$
CA	2,0	$0,1 \pm 0,0^g$	$0,1 \pm 0,0^f$	$0,4 \pm 0,0^d$	$0,0 \pm 0,0^{gh}$	$0,7 \pm 0,0^f$
MC	1,1	$0,1 \pm 0,0^g$	$0,0 \pm 0,0^f$	$0,2 \pm 0,0^d$	$0,0 \pm 0,0^h$	$0,1 \pm 0,0^g$

Px: Produtividade volumétrica de biomassa. Ax: Produtividade volumétrica de Amido. ASTx: Produtividade volumétrica de AST. Cx: Produtividade volumétrica de carboidratos totais. Lx: Produtividade volumétrica de lipídios. Ptx: Produtividade volumétrica de proteínas. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra ^{a,b,c,d,e,f,g,h} diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A *Chlorella* sp. isolada neste estudo quando cultivada em meio CHU apresentou a maior fração lipídica ($22 \pm 0,5\%$) (Tabela 12) em comparação aos demais meios analisados ($p < 0,05$). Alguns autores como Mahmoud *et al.* (2015) cultivando microalgas do gênero *Chlorella*, obtiveram um teor de 37% de lipídios em condições fotoautotróficas, todavia, utilizando águas residuais com diferentes quantidades de nitrato. Paranjape; Leite; Hallenbeck (2016b) cultivando a espécie *Chlorella sorokinina* obtiveram valores de 33% de lipídios em sua biomassa, quando pequenas quantidades de NaNO_3 foram adicionadas, concluindo que a produtividade lipídica diminuiu à medida que a concentração de nitrato aumentou. Segundo estes autores, a inanição de nitrogênio pode induzir o acúmulo de lipídios em condições fotoautotróficas.

Tabela 12 - Produção de biomassa, teores de amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Chlorella* sp. em diferentes meios de cultivo

Meio de Cultivo	Biomassa (g L ⁻¹)	Teor de Amido (%)	Teor de AST (%)	Teor de Carboidratos Totais (%)	Fração Lipídica (%)	Teor de Proteínas (%)
CHU	0,9	31,5±0,7 ^b	8,9±0,3 ^{cd}	31,5±1,0 ^{ab}	22,0±0,5 ^a	15,9±2,9 ^c
BBM	0,8	20,9±1,5 ^b	9,8±0,2 ^c	29,9±1,7 ^b	13,4±0,5 ^c	41,3±2,4 ^a
LC	0,3	14,5±0,4 ^d	5,2±0,8 ^g	14,1±0,2 ^d	5,3±0,5 ^e	40,9±1,5 ^a
CHU _{MT}	0,9	19,1±0,5 ^c	23,5±0,9 ^a	29,9±1,4 ^b	7,7±0,5 ^d	41,8±2,1 ^a
LC _{MT}	0,8	37,7±0,8 ^a	14,2±0,6 ^b	30,0±0,9 ^a	16,6±0,1 ^b	25,0±1,8 ^b
ASM1	0,7	9,3±0,7 ^e	8,8±0,1 ^{cd}	20,5±1,3 ^c	12,9±0,5 ^c	43,5±2,9 ^a
BG-11	0,4	4,9±0,4 ^f	5,8±0,4 ^{fg}	13,5±0,1 ^d	8,5±0,4 ^d	36,7±1,8 ^b
CA	0,1	6,0±0,2 ^f	7,8±0,2 ^{de}	20,6±0,9 ^c	4,0±0,7 ^{ef}	38,2±0,7 ^b
MC	0,1	10,3±0,5 ^e	7,0±0,8 ^e	18,5±1,2 ^c	3,5±0,2 ^f	14,3±1,5 ^c

Resultados com médias não seguidas pela mesma letra ^{a,b,c,d,e,f,g} diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Magro *et al.* (2016) reportam que a forma de obter maior produção de lipídios seria a redução de alguns nutrientes disponíveis no meio de cultura, especialmente o nitrogênio, esta estratégia causa estresse ao micro-organismo e afeta o seu crescimento, podendo induzir o aumento do acúmulo de lipídios nas células. Vários autores como Negi *et al.* (2015); Lam *et al.* (2016), Su *et al.* (2016), Santana *et al.* (2017) e Katiyar *et al.* (2017) também mencionam a importância do estresse nutricional e também do estresse causado por fatores físicos como temperatura e pH no cultivo para obter melhores produções de bioprodutos de interesse como os compostos de reserva microalgais.

Su *et al.* (2016) reportaram que as microalgas da classe Chlorophyceae podem acumular mais de 20% de lipídios totais em sua biomassa seca e além disso, em ambientes de estresse, algumas espécies podem acumular mais de 50% de óleo, o que corresponde a rendimentos de 1000-6500 kg (m³)⁻¹ ano⁻¹ de óleo. Tais autores, citam que esses valores correspondem a um rendimento 60 vezes maior do que o obtido a partir da soja, e aproximadamente cinco vezes a produção de óleo de palma por hectare de terra. No presente estudo a maior produtividade lipídica encontrada para a microalga *Chlorella* sp. foi de 0,7 kg (m³)⁻¹ ano⁻¹ quando cultivada autotroficamente em meio CHU.

Os resultados apresentados na Tabela 12 exibem que a *Chlorella* sp. cultivada em meio LC_{MT} apresentou a maior quantidade de amido (37,7±0,8%) e um elevado teor de AST (14,2±0,6%) (p<0,05). Nas mesmas condições de cultivo, entretanto em um meio denominado Bristol`S, os autores Cassuriaga *et al.* (2014) cultivando a espécie *Chlorella minutissima*, obtiveram um teor de 21,5% de carboidratos, valor menor ao obtido no meio LC_{MT} neste estudo. Todavia, quando os mesmos autores realizaram o cultivo desta microalga provocando estresse pela redução da fonte de nitrogênio (com redução de 50% KNO₃) e com adição de fontes de carbono (19,16 mg L⁻¹ de xilose e 0,89 mg L⁻¹ de arabinose), obtiveram 66,4% de carboidratos. Esse aumento na produção de carboidratos confirma a influência da redução de fontes nitrogenadas na composição da biomassa de microalgas, como as do gênero *Chlorella*, e pode influenciar não apenas no acúmulo de lipídios mas também de carboidratos (NEGI *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos das análises de composição da *Desmodesmus* sp. estão listados nas Tabela 13 e 14. Para diferentes meios de cultura os conteúdos de lipídios e carboidratos encontrados foram distintos (p<0,05), sendo o maior conteúdo lipídico (16,1±0,8%) obtido no meio de cultura MC, a maior porcentagem de amido (7,6±0,6%) e maior produtividade volumétrica de biomassa (14,4 mg L⁻¹ d⁻¹) no cultivo em meio ASM1, enquanto que a maior fração de AST (7,2±0,5%) foi obtida no meio de cultura BG-11 (p<0,05).

Tabela 13 – Produção de biomassa, teores de amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Desmodesmus* sp. em diferentes meios de cultivo

Meio de Cultivo	Biomassa (g L ⁻¹)	Teor de Amido (%)	Teor de AST (%)	Teor de Carboidratos Totais (%)	Fração Lipídica (%)	Teor de Proteínas (%)
CHU	0,6	3,0±0,2 ^{bcd}	4,5±0,1 ^b	6,9±0,1 ^d	12,4±0,6 ^b	44,4±1,4 ^a
BBM	0,5	2,5±0,8 ^{cd}	3,7±0,2 ^{cd}	6,9±0,5 ^d	9,4±0,1 ^d	34,9±0,9 ^b
LC	0,5	3,2±0,2 ^{bcd}	4,3±0,2 ^{bc}	9,2±0,6 ^{abc}	10,6±0,5 ^c	11,2±0,6 ^e
CHU _{MT}	2,0	3,2±0,5 ^{bcd}	4,9±0,1 ^b	8,1±0,3 ^{cd}	9,8±0,7 ^c	38,2±1,9 ^b
LC _{MT}	0,7	3,1±0,4 ^{bcd}	3,1±0,3 ^d	7,2±0,5 ^d	9,7±0,7 ^c	20,3±1,8 ^d
ASM1	0,9	7,6±0,6 ^a	5,0±0,3 ^b	10,3±0,5 ^{ab}	12,5±0,7 ^b	19,4±2,8 ^d
BG-11	0,4	4,3±0,7 ^b	7,2±0,5 ^a	10,7±0,4 ^a	7,1±0,5 ^c	44,8±1,9 ^a
CA	0,6	1,9±0,1 ^d	4,4±0,2 ^{bc}	8,1±0,3 ^{bc}	7,8±0,2 ^d	8,8±0,8 ^e
MC	0,8	3,9±0,6 ^{bc}	1,9±0,2 ^e	7,2±0,5 ^d	16,1±0,8 ^a	28,3±2,1 ^c

Resultados com médias não seguidas pela mesma letra ^{a,b,c,d,e} diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 14 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Desmodesmus* sp. em diferentes meios de cultivo

Meio de Cultivo	Px (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Ax (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	ASTx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Cx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Lx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Ptx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
CHU	9,8	0,3±0,0 ^c	0,4±0,0 ^b	0,7±0,0 ^{de}	1,2±0,0 ^c	4,3±0,1 ^a
BBM	7,7	0,2±0,0 ^c	0,3±0,0 ^{cd}	0,5±0,0 ^f	0,7±0,0 ^f	2,7±0,0 ^c
LC	7,5	0,2±0,0 ^c	0,3±0,0 ^c	0,7±0,0 ^{de}	0,8±0,0 ^e	0,8±0,0 ^e
CHU _{MT}	6,9	0,2±0,0 ^c	0,3±0,0 ^c	0,6±0,0 ^{ef}	0,7±0,0 ^{ef}	2,6± ^{cd}
LC _{MT}	10,3	0,3±0,0 ^c	0,3±0,0 ^c	0,7±0,0 ^{cd}	1,0±0,0 ^d	2,1±0,1 ^d
ASM1	14,4	1,1±0,0 ^a	0,7±0,0 ^a	1,5±0,0 ^a	1,8±0,0 ^b	2,8±0,3 ^c
BG-11	5,9	0,2±0,0 ^c	0,4±0,0 ^b	0,6±0,0 ^{def}	0,4±0,0 ^f	2,6±0,1 ^{cd}
CA	10,2	0,2±0,0 ^c	0,4±0,0 ^b	0,8±0,0 ^{bc}	0,8±0,0 ^e	0,9±0,0 ^e
MC	12,4	0,5±0,0 ^b	0,2±0,0 ^d	0,9±0,0 ^b	1,9±0,0 ^a	3,5±0,2 ^b

Px: Produtividade volumétrica de biomassa. Ax: Produtividade volumétrica de Amido. ASTx: Produtividade volumétrica de AST. Cx: Produtividade volumétrica de carboidratos totais. Lx: Produtividade volumétrica de lipídios. Ptx: Produtividade volumétrica de proteínas. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra ^{a,b,c,d,e} diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Comparando os resultados obtidos com outros estudos envolvendo microalgas do gênero *Desmodesmus*, foi possível observar que houve diferentes respostas quanto a produção de biomassa de acordo com as condições de cultivo. Ji *et al.* (2013) encontraram uma produção máxima de biomassa para *Desmodesmus* sp. de 0,75 g L⁻¹, quantidade inferior ao encontrado neste estudo (0,87 g L⁻¹) quando cultivado no meio ASM1. Ríos *et al.* (2017) realizaram cultivo com *Desmodesmus*, porém foi realizado em meio mixotrófico com adição de glicose (10 g L⁻¹) como fonte de carbono, e obtiveram um teor de lipídios de 25,1%, teor mais elevado que o maior resultado encontrado nesta pesquisa no meio MC (16,1±0,8%). Assim como no trabalho de Ríos *et al.* (2015), com esse mesmo gênero estudado em meio BG-11, foi encontrado um conteúdo lipídico de 23%, em comparação no mesmo meio foi de (7,1±0,5) neste trabalho. Todavia, no trabalho desses autores só foi encontrado este teor lipídico quando o cultivo foi submetido a uma privação total de nitrogênio.

A diferença observada nessas estratégias de estresse as microalgas e seus respectivos resultados demonstram a necessidade de se avaliar a concentração de nutrientes ideal para o metabolismo de cada microalga e se as melhores estratégias seriam a redução ou adição de mais nutrientes. Magro *et al.* (2016) mencionam que os micro-organismos necessitam de diversos nutrientes para a sua síntese celular, sendo assim, as concentrações de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultura podem gerar um aumento dos compostos de reserva de microalgas, além de serem macronutrientes importantes para o crescimento e metabolismo das células microalgais. Neste sentido, as microalgas quando submetidas a restrição de algum dos nutrientes mencionados, podem alterar as suas rotas metabólicas afim

de se adaptarem (LAM; LEE, 2012), fato que poderia levar a uma maior produção dos bioprodutos de interesse.

Os resultados de produtividade e análises de composição da microalga *Phormidium* sp. cultivada no meio de cultura CHU estão listados na Tabela 15. Neste estudo, não foi possível realizar o seu cultivo nos demais meios selecionados devido as dificuldades encontradas durante as etapas de isolamento e manutenção dos cultivos desta microalga. A possível justificativa para as dificuldades no cultivo, isolamento e análises das cianofíceas *Phormidium* sp. pode estar atrelada à capacidade destas microalgas em formarem massas de filamentos emaranhados, que podem ser mucilaginosas ou membranáceas (BICUDO; MENEZES, 2006). Esse tipo de organização das suas células filamentosas em colônia dificulta o processo de isolamento e até mesmo da identificação, e desta forma a manipulação do seu cultivo se tornou mais difícil. A microalga *Phormidium* sp. é descrita como um gênero excepcionalmente difícil de identificar e cultivar, com características morfológicas altamente variáveis (KOMÁREK e ANAGNOSTIDIS, 2005).

A produtividade volumétrica de biomassa para esta cianofícea foi de $7,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, o conteúdo lipídico de $4,7 \pm 0,8\%$ e produtividade lipídica de $0,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$; o conteúdo de carboidratos totais de $36,5 \pm 0,9\%$ e a produtividade deste bioproduto de $2,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 15). Estes resultados demonstram que os teores de carboidratos obtidos para *Phormidium* sp. neste único meio utilizado foram superiores aos encontrados para *Desmodesmus* sp. em todos meios de cultivo analisados e próximos dos maiores valores encontrados neste estudo para a *Chlorella* sp. Este fato evidencia a importância da otimização do cultivo desta microalga filamentosa e a continuidade dos testes de crescimento empregando diferentes formulações de meio de cultura.

Tabela 15 – Resultados das determinações analíticas do gênero *Phormidium* sp. cultivado no meio de crescimento CHU

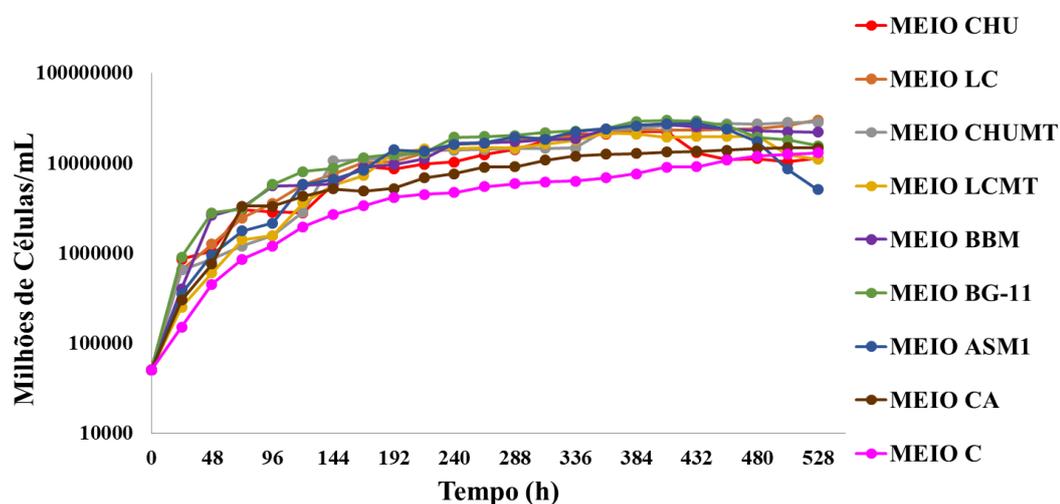
Determinações Analíticas	Meio de Cultivo CHU
Produtividade volumétrica de biomassa ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	$7,5 \pm 0,0$
Biomassa (g L^{-1})	0,6
Amido (%)	$30,4 \pm 0,8$
AST (%)	$9,9 \pm 0,3$
Carboidratos Totais (%)	$36,5 \pm 0,9$
Fração Lipídica (%)	$4,7 \pm 0,8$

Proteínas (%)	10,6±1,1
Produtividade volumétrica de Amido (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	2,2±0,0
Produtividade volumétrica de AST (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,7±0,0
Produtividade volumétrica de Carboidratos Totais (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	2,7±0,0
Produtividade volumétrica de Lipídios (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,3±0,0
Produtividade volumétrica de Proteínas (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	0,8±0,0

O monitoramento e determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento são fundamentais para as avaliações de cultivos microalgais para a produção de biocombustíveis (CALIXTO *et al.*, 2018; JAYAKUMAR *et al.*, 2017) e para o conhecimento das microalgas em estudo. Os perfis de crescimento celular da *Chlorella* sp. e *Desmodesmus* sp. estão ilustrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. O monitoramento do crescimento do gênero *Phormidium* também não foi realizado por ter apresentado as mesmas dificuldades descritas anteriormente.

A *Chlorella* sp. foi monitorada durante 22 dias, em intervalos de 24 horas (Figura 7) e apresentou taxas de crescimento específica como 0,30 d⁻¹ no meio BG-11 e 0,09 d⁻¹ no meio Carefoot (Tabela 16). De acordo com Sirajunnisa; Surendhiran (2016) o gênero *Chlorella* é um dos mais estudados na produção de biocombustíveis, com elevada produção de biomassa e com um período de duplicação que varia de 4 a 24 horas. Essa microalga multiplica rapidamente e exige a presença de alguns fatores, tais como: temperatura, intensidade de luz, pH balanceado, níveis de CO₂ e nutrientes, os quais coletivamente afetam a taxa de crescimento e influenciam a composição celular (MOBIN; ALAM, 2017).

Figura 7 – Comparação do crescimento da microalga *Chlorella* sp. nos nove meios pela técnica de contagem celular



As taxas de crescimento encontradas para esta microalga (Tabela 16) estão próximas das observadas por outros autores estudando o gênero *Chlorella*. Dentre estes resalta-se os estudos de Song *et al.* (2013), que encontraram para *Chlorella vulgaris* uma taxa de divisão celular de $0,17 \text{ d}^{-1}$ e os de Pereira Neto *et al.* (2013) que analisando a espécie *Chlorella minutissima* encontraram $0,33 \text{ d}^{-1}$. Os estudos de Illman *et al.* (2000) avaliaram várias cepas de *Chlorella*, e encontraram para *C. vulgaris* $0,99 \text{ d}^{-1}$; para *C. emersonii* $0,88 \text{ d}^{-1}$; *C. protothecoides* $0,33 \text{ d}^{-1}$; *C. sorokiniana* $0,58 \text{ d}^{-1}$ e *C. minutissima* $0,43 \text{ d}^{-1}$, também comprovam haver uma ampla taxa de variação no crescimento entre espécies do mesmo gênero, dependendo das condições de cultivo e do meio de cultura selecionado como foi encontrado neste trabalho (YU *et al.*, 2011; CALIXTO *et al.*, 2018).

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos de crescimento celular da *Desmodesmus* sp. e *Chlorella* sp. nos diferentes meios de cultivo analisados

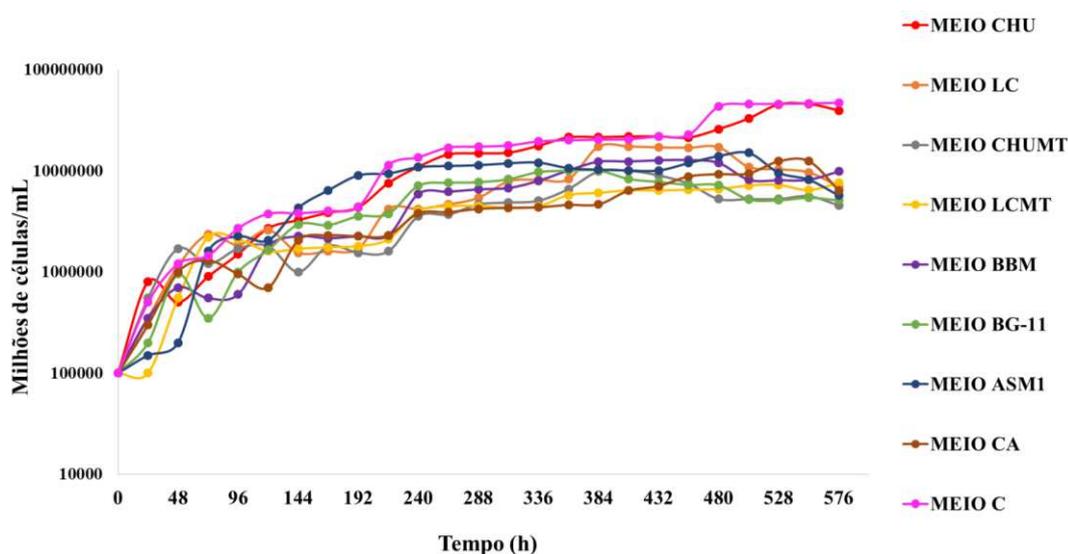
Meios de cultura	<i>Desmodesmus</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.	
	μ_x (d^{-1})	Tempo de geração (h)	μ_x (d^{-1})	Tempo de geração (h)
BBM	0,22	76,17	0,21	80,60
BG-11	0,07	231,05	0,30	56,35
CHU	0,37	45,01	0,17	96,27
LC _{MT}	0,12	133,30	0,25	66,65
LC	0,19	83,51	0,12	138,63
ASM1	0,33	50,97	0,18	91,20
CA	0,16	101,93	0,09	177,73
MC	0,35	47,15	0,10	161,19
CHU _{MT}	0,11	154,03	0,11	147,48

d: dias. h: horas.

A Figura 8 ilustra o perfil do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp., acompanhada por 24 dias de cultivo, enquanto as taxas de crescimento específicas nos meios estudados estão representadas na Tabela 16. No meio CHU foi observada uma taxa de $0,37 \text{ d}^{-1}$ enquanto que no meio BG-11 uma taxa de crescimento de $0,07 \text{ d}^{-1}$. Esses dois meios apresentam grandes diferenças na composição e concentração dos nutrientes, assim como na fonte dos macronutrientes (Tabela 8), o que facilita ou impede a assimilação desses nutrientes por determinadas espécies de microalgas. Esse fato pode também influenciar no crescimento

celular, como é discutido nos trabalhos de Yu *et al.* (2011) e Calixto *et al.* (2018), que falam sobre a influência das condições de cultivo sobre as taxas de desenvolvimento das microalgas. Comparando as taxas de crescimento encontradas com o trabalho de Diniz *et al.* (2017) que cultivaram a *Desmodesmus* sp. em efluentes autoclavados de águas residuais municipais, observa-se que esses autores encontraram uma taxa de $0,78 \text{ d}^{-1}$, valor superior a todas encontradas nos meios utilizados neste trabalho. Esse resultado demonstra os efeitos positivos que podem ser alcançados com o uso de um efluente contendo nutrientes descartados como fósforo e nitrogênio que são capazes de suportar o crescimento de microalgas, com elevadas taxas de crescimento e produção de biomassa.

Figura 8 – Comparação do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. nos nove meios pela técnica de contagem celular

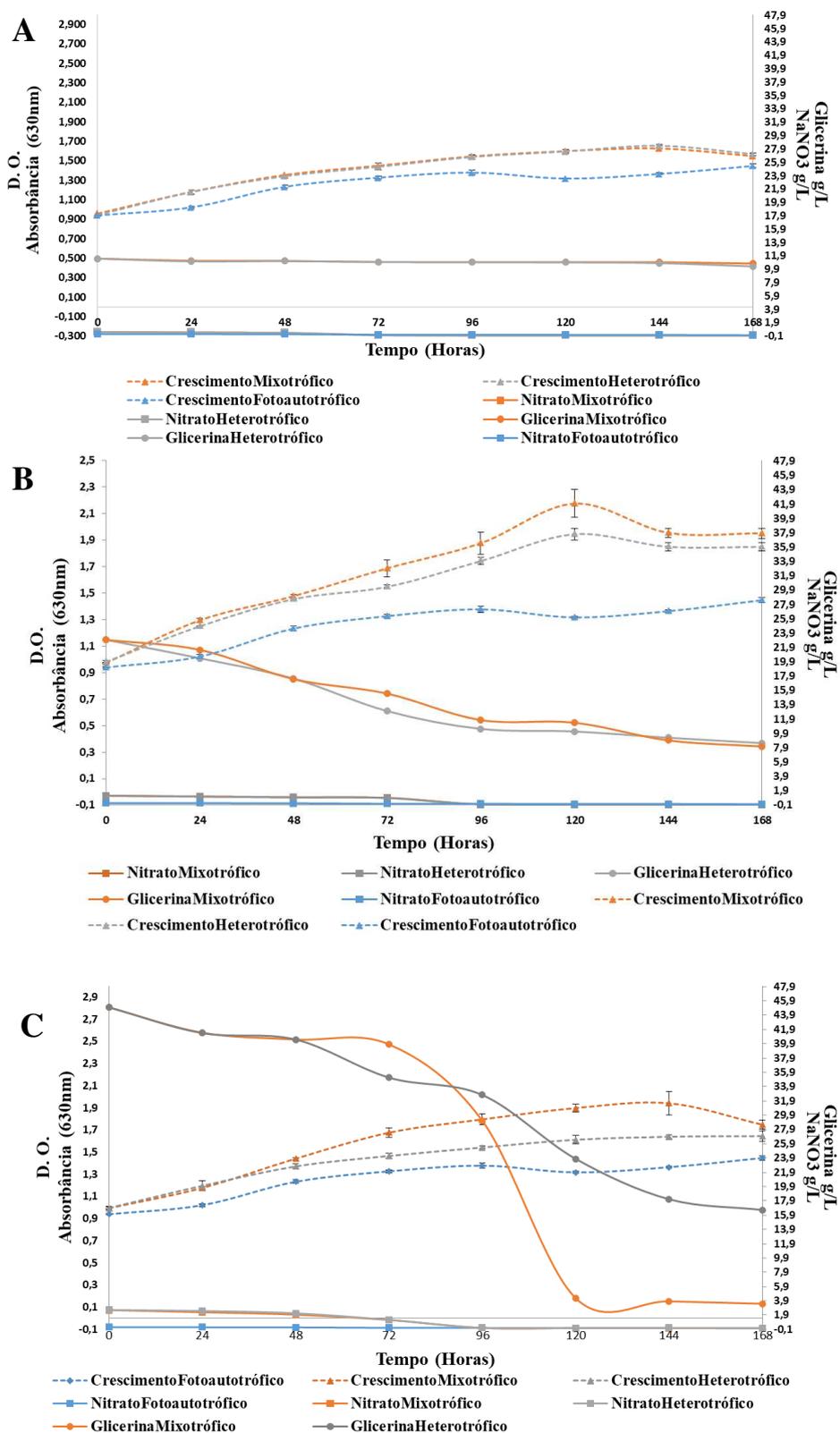


5.2 Segunda etapa

Considerando o conjunto de resultados obtidos combinando carboidratos totais ($31,5 \pm 1,0\%$) e lipídios totais ($22 \pm 0,5\%$), bem como a menor quantidade de proteínas ($15,9 \pm 2,9\%$), a microalga *Chlorella* sp. cultivada no meio CHU sob condições fotoautotróficas foi selecionada para os experimentos seguintes.

Nas Figuras 9A - B - C encontram-se o consumo das fontes de carbono e nitrogênio pela microalga do gênero *Chlorella* e o seu crescimento acompanhado por meio de D.O.. Pela Figura 9A é possível observar que o perfil de crescimento da *Chlorella* nas condições de cultivos mixotrófico e heterotrófico, utilizando $11,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerina e $0,683 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , ocorreram de forma semelhante. Este fato difere daquele observado nas

Figura 9 - Crescimento da *Chlorella* sp. em batelada simples no meio CHU com adição de glicerina e cultivo controle sem glicerina



D.O.: Densidade óptica. Cultivo de 8 dias. A: 11,5 g L⁻¹ de glicerina e 0,683 g L⁻¹ de NaNO₃. B: 23 g L⁻¹ de glicerina e 1,366 g L⁻¹ de NaNO₃. C: 46 g L⁻¹ de glicerina e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ e cultivo fotoautotrófico controle sem adição de glicerina e 0,250 g L⁻¹ de NaNO₃.

condições de cultivo fotoautotrófico, o qual foi conduzido em meio sem adição de glicerina. Nas Figuras 9B e 9C também foi observado que o perfil do cultivo fotoautotrófico diferiu dos demais, mixotrófico e heterotrófico, apresentando um crescimento inferior. Este fato pode estar atrelado a presença de glicerina como fonte de carbono, independente da concentração utilizada no meio de cultivo. Esta circunstância pode ser confirmada por meio dos menores valores de D.O. obtidos durante o período monitorado, resultando em uma concentração final de biomassa de 1,5 g L⁻¹.

Nos cultivos mixotróficos utilizando as maiores concentrações de glicerina, 23 g L⁻¹ de glicerina e 1,366 g L⁻¹ de NaNO₃ (Figura 9 B) e 46 g L⁻¹ de glicerina e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ (Figura 9 C) foi possível observar um perfil de crescimento superior aos demais cultivos após 48 horas, fato este confirmando por meio dos resultados das leituras de D.O.

As taxas de crescimento dos cultivos mixo e heterotróficos suplementados com a glicerina e dos fotoautotróficos sem suplementação não diferiram estatisticamente (Tabela 17) ($p > 0,05$). Esse fato ocorreu independente da forma de condução dos cultivos, ou seja, aqueles conduzidos em batelada simples ou em batelada alimentada. Os dados obtidos foram semelhantes aos de LEITE *et al.* (2015), que em seus experimentos utilizaram a glicerina como fonte de carbono para o cultivos de dez cepas de microalgas do gênero *Chlorella* e observaram que apenas três não tiveram suas taxas de crescimento afetadas pela suplementação da glicerina. Este fato também foi observado no presente estudo. Paranjape; Leite; Hallenbeck (2016a) realizaram cultivos com duas linhagens de *Chlorella* com adição de glicerina e observaram que a taxa de crescimento de uma das linhagens, igualmente ao obtido neste estudo, foi indiferente à presença (em cultivos mixotróficos) ou ausência (cultivos fotoautotróficos) de glicerina e concentrações de nitrato.

Tabela 17 - Taxas de crescimento da *Chlorella* sp. em cultivos com diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio

Cultivos batelada simples	μ_x (h ⁻¹)	Cultivos batelada alimentada	μ_x (h ⁻¹)
Alg0	0,008 ^a	AlgB0	0,008 ^a
Alg11,5M	0,009 ^a	AlgB11,5M	0,008 ^a
Alg23M	0,012 ^a	AlgB23M	0,008 ^a
Alg46M	0,008 ^a	AlgB46M	0,009 ^a
Alg11,5H	0,009 ^a	AlgB11,5H	0,007 ^a
Alg23H	0,010 ^a	AlgB23H	0,008 ^a
Alg46H	0,008 ^a	AlgB46H	0,010 ^a

h: horas. μ_x : Taxa de crescimento. Resultados com médias não seguidas pela mesma letra ^{a,b,c} diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na Figura 9A é possível observar que a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) se esgotou completamente em 72 horas nos cultivos mixo e heterotrófico, o que não foi observado no experimento conduzido em condição de crescimento fotoautotrófico. No entanto, nas Figuras 9 B e C foi observado que o nitrato de sódio esgotou-se em 96 horas nos cultivos conduzidos em condições mixo e heterotróficos.

Em se tratando do consumo de glicerina, foi observado que em nenhuma das condições de cultivos mixo e heterotrófico, independente das concentrações de glicerina utilizadas (Figura A: 11,5 g L⁻¹; Figura B: 23 g L⁻¹ e Figura C: 46 g L⁻¹), ocorreu o esgotamento desta fonte de carbono. No cultivo com adição de 11,5 g L⁻¹ de glicerina observou-se que houve um menor consumo deste suplemento, em comparação com os demais cultivos, conduzidos em meios com maiores concentrações desta fonte.

A microalga *Chlorella* apresentou uma maior produção (2,9 g L⁻¹) e produtividade volumétrica (366,7±1,3 mg L⁻¹ dia⁻¹) de biomassa na condição de cultivo Alg23M, diferindo estatisticamente dos demais experimentos (Tabela 18 e 19). Essas variáveis apresentaram valores superiores em 1,9 vezes em relação a condição experimental Alg0. Entretanto, foi observado que a adição de glicerina não afetou a produção de carboidratos totais em nenhuma condição de cultivo realizado (p> 0,05) (Tabela 18). Este fato evidenciou que a adição da glicerina como fonte de carbono não influenciou em uma maior produção de carboidratos totais, fonte de interesse para produção de etanol microalgal.

O teor de lipídios totais presente nas células de *Chlorella* sp. foi maior nos experimentos realizados nas condições representadas em Alg23M com valores de 20,9±1,3% e Alg23H com 20,7±0,3%. Estes valores foram estatisticamente semelhantes (p> 0,05), no entanto, diferiram dos demais cultivos (p< 0,05), apresentando, por exemplo, uma concentração de lipídios 1,2 vezes superior em comparação ao teor encontrado no experimento sem a presença de glicerina (Alg0). Este resultado corrobora com a afirmação dos autores Ma *et al.* (2016), que relataram que cultivos utilizando a microalga *Chlorella* com adição de glicerol residual apresentam melhor acúmulo de lipídios em comparação a cultivos sem a adição desse subproduto. Porém, no presente estudo este fato foi observado em apenas uma das condições estudadas, ou seja, naquela utilizando 23 g L⁻¹ de glicerina adicionada de 1,366 g L⁻¹ de NaNO₃. Esse resultado destaca a importância de se realizar estudos que avaliem diferentes concentrações da suplementação dos subprodutos agroindustriais, a fim de alcançar resultados mais satisfatórios e assim, contribuir para a redução dos entraves da produção de biomassa e lipídios microalgais.

Tabela 18 – Produção de biomassa e teores amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Chlorella* sp. cultivada em meio CHU com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio

Códigos	Biomassa (g L⁻¹)	Teor de Amido (%)	Teor de AST (%)	Teor de Carboidratos totais (%)	Teor de Lipídios (%)	Teor de Proteínas (%)
Alg0	1,5±0,0 ^{d4}	3,0±0,0 ^{bc1}	6,8±0,5 ^{a1}	10,0±0,1 ^{a1}	17,0±1,0 ^{b2}	34,2±3,5 ^{a1}
Alg11,5M	2,5±0,0 ^{b*}	6,5±1,2 ^{a*}	3,6±1,1 ^{b*}	10,0±0,2 ^{a*}	9,7±0,9 ^{c*}	29,5±3,1 ^{a*}
Alg23M	2,9±0,0 ^{a*}	4,0±0,5 ^{b*}	4,2±0,9 ^{b*}	10,1±0,2 ^{a*}	20,9±1,3 ^{a*}	39,6±3,3 ^{a*}
Alg46M	2,1±0,0 ^{c*}	1,8±0,0 ^{c*}	0,9±0,0 ^{c*}	9,8±0,2 ^{a*}	8,1±1,6 ^{c*}	28,0±4,6 ^{a*}
Alg11,5H	2,3±0,0 ^{2**}	3,2±0,8 ^{1**}	3,3±0,5 ^{2*}	10,0±0,7 ^{1*}	6,8±0,4 ^{3**}	33,4±3,0 ^{1*}
Alg23H	2,7±0,0 ^{1**}	3,7±0,0 ^{1*}	3,4±0,0 ^{2*}	10,4±0,7 ^{1*}	20,7±0,3 ^{1*}	27,6±4,8 ^{1*}
Alg46H	1,9±0,0 ^{3**}	1,5±0,5 ^{2*}	0,8±0,0 ^{3*}	9,6±0,7 ^{1*}	8,2±1,6 ^{3*}	30,0±3,3 ^{1*}

Alg 0: cultivo controle com ausência de glicerina e 0,250 g L⁻¹ de NaNO₃, Alg11,5M, Alg23M e Alg46M para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições mixotróficas, respectivamente. Alg11,5H, Alg23H e Alg46H para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições heterotróficas, respectivamente. Letras, números e asteriscos sobrescritos não semelhantes em uma mesma coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 19 – Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Chlorella* sp. cultivada em meio CHU com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio

Códigos	Px (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Ax (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	ASTx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Cx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Lx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Ptx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
Alg0	191,0±3,6 ^{d4}	5,9±0,1 ^{c2}	13,0±0,6 ^{a1}	19,1±0,2 ^{d3}	32,3±1,0 ^{b2}	64,9±5,3 ^{c2}
Alg11,5M	315,0±1,9 ^{b*}	20,7±3,1 ^{a*}	11,4±2,8 ^{a*}	31,6±0,7 ^{b*}	30,8±2,4 ^{bc*}	93,4±5,9 ^{b*}
Alg23M	366,7±1,3 ^{a*}	15,0±1,4 ^{b*}	15,6±2,4 ^{a*}	37,6±1,6 ^{a*}	77,0±4,0 ^{a*}	146,1±3,2 ^{a*}
Alg46M	266,5±6,2 ^{c*}	4,7±0,0 ^{c*}	2,5±0,1 ^{b*}	25,3±0,8 ^{c*}	21,1±3,9 ^{c*}	72,0±1,9 ^{c*}
Alg11,5H	289,0±1,8 ^{2**}	9,4±1,8 ^{1**}	9,8±1,4 ^{2*}	29,1±1,5 ^{2*}	19,7±1,1 ^{3**}	96,5±2,6 ^{1*}
Alg23H	344,6±4,6 ^{1**}	12,8±0,2 ^{1*}	11,7±0,0 ^{1,2*}	36,0±1,7 ^{1*}	71,5±1,7 ^{1*}	95,1±7,3 ^{1**}
Alg46M	237,5±3,6 ^{3**}	3,8±0,9 ^{2*}	2,0±0,1 ^{3*}	23,0±1,2 ^{3*}	19,7±3,5 ^{3*}	71,3±6,7 ^{2*}

Alg0: cultivo controle com ausência de glicerina e 0,250 g L⁻¹ de NaNO₃. Alg11,5M, Alg23M e Alg46M para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições mixotróficas, respectivamente. Alg11,5H, Alg23H e Alg46H para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições heterotróficas, respectivamente. Px: Produtividade volumétrica de biomassa. Ax: Produtividade volumétrica de Amido. ASTx: Produtividade volumétrica de AST. Cx: Produtividade volumétrica de carboidratos totais. Lx: Produtividade volumétrica de lipídios. Ptx: Produtividade volumétrica de proteínas. Letras, números e asteriscos sobrescritos não semelhantes em uma mesma coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

No estudo de Leite *et al.* (2015) foi relatado que o glicerol fornecido aos cultivos mixotróficos de microalgas do gênero *Chlorella* aumentam a produtividade lipídica em quase 4 vezes quando comparadas aos cultivos fotoautotróficos. Os resultados obtidos por esses autores foram superiores aos encontrados neste estudo, entretanto, corroboram com a eficácia da adição deste subproduto no aumento da produção de biomassa e lipídios.

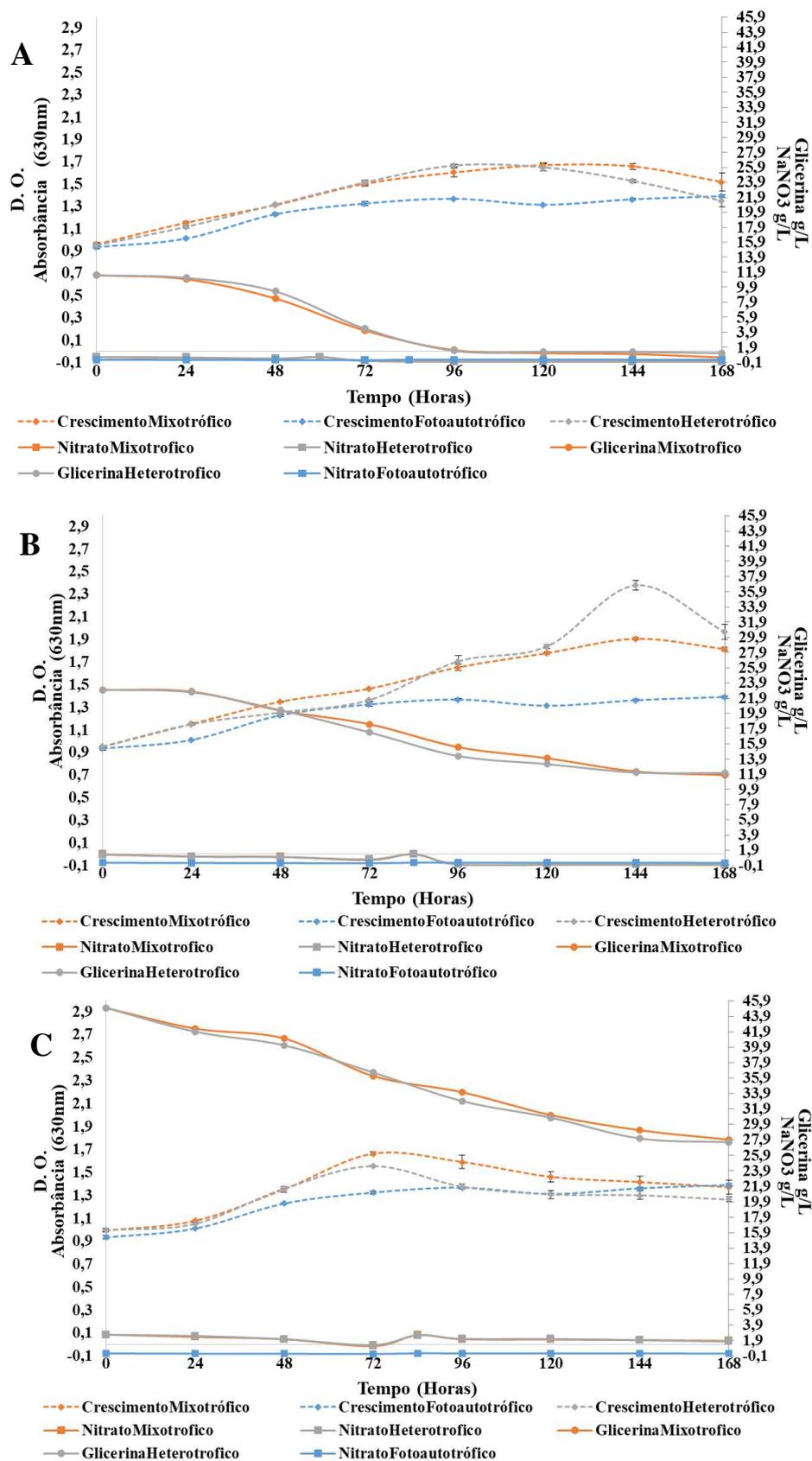
Na Figura 10 foi possível observar o momento da suplementação de NaNO_3 no experimento realizado com cultivo fotoautotrófico que ocorreu no período de 84 horas, assim como, nos cultivos mixotróficos e heterotróficos com adição de 23 g L^{-1} e 46 g L^{-1} de glicerina. Nos experimentos mixotróficos e heterotróficos com adição de $11,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerina, a suplementação com NaNO_3 ocorreu com 60 horas de cultivo. Em nenhum dos cultivos, até o último dia de monitoramento, não foi observado o esgotamento do nitrato de sódio (Figuras 10 A, B e C).

As análises de consumo de glicerina, permitiram observar que não houve esgotamento desta fonte de carbono em nenhum dos cultivos realizados, independente das concentrações utilizadas (Figuras 10A, B, C). No cultivo com adição de $11,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerina conduzido em batelada alimentada (Figura 10A) foi observado o maior consumo deste suplemento quando comparados com os demais cultivos preparados nas mesmas condições de processo, todavia com as maiores concentrações desta fonte de carbono.

Ao comparar os cultivos realizados com adição de $11,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerina em sistemas conduzidos em batelada simples e batelada alimentada foi possível observar um efeito positivo da alimentação do sistema com a fonte de nitrogênio (NaNO_3), pois houve um maior consumo da fonte de carbono pela microalga.

Nas Figuras 10A, B e C encontram-se o consumo das fontes de carbono e nitrogênio da microalga do gênero *Chlorella* e o seu crescimento acompanhado por meio de D.O. em sistemas conduzidos em batelada alimentada. Nas condições estudadas foi possível observar na Figura 10A que o perfil de crescimento da *Chlorella* sp. nas condições de cultivos mixotrófico e heterotrófico, utilizando $11,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerina e $0,683 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 , apresentaram perfil de crescimento semelhante até as 120 horas de cultivo. Após este período o crescimento microalgal em condições mixotróficas foi 13% maior que aquele observado em condições heterotróficas. O crescimento obtido em condições de cultivo fotoautotrófico (Figura 10A), ou seja, meio sem adição de glicerina, foi menor quando comparado aos demais sistemas de cultivo até o período de 144 horas.

Figura 10 - Crescimento da *Chlorella* sp. em batelada alimentada no meio CHU com adição de glicerina e cultivo controle sem glicerina



Na Figura 10B também foi observado que o perfil do cultivo fotoautotrófico diferiu dos demais, mixotrófico e heterotrófico, após 72 horas de cultivo chegando a apresentar um crescimento inferior de até 75% quando comparado ao sistema heterotrófico e 40% em relação ao sistema mixotrófico. O crescimento heterotrófico e mixotrófico da *Chlorella* sp. utilizando 23 g L⁻¹ de glicerina e 1,366 g L⁻¹ de NaNO₃ apresentaram perfil de crescimento semelhante até 120 horas de cultivo. Após este período o crescimento em condições heterotrófica foi 25% maior que aquele observado em condições mixotróficas.

No estudo proposto por Katiyar *et al.* (2017) foi usado o glicerol como suplemento para o cultivo da *Chlorella* sp. em cultivos heterotróficos obtendo-se um aumento de quase 2 vezes na produtividade de biomassa dessa microalga, 446,50±1,5 mg L⁻¹ dia⁻¹. Esse resultado foi semelhante ao obtido neste estudo para o experimento AlgB23H conduzido em batelada alimentada. Nestas condições de estudo também foi obtido uma produtividade de biomassa (412,2±3,5 mg L⁻¹ dia⁻¹) superior em 2,1 vezes em relação ao controle, AlgB0, com 197,6±3,6 mg L⁻¹ dia⁻¹ (Tabela 20). Ao comparar a produção de biomassa de AlgB23H (3,2±0,0 g L⁻¹) com a de AlgB0 (1,5±0,0 g L⁻¹) (Tabela 21) também foi observado a relação de aumento.

A produtividade de lipídios foi 2,3 vezes maior no cultivo AlgB23H (47,0±1,2 mg L⁻¹ dia⁻¹) em relação ao AlgB0 (20,4±1,3 mg L⁻¹ dia⁻¹) (Tabela 20). Estes dados também corroboram com os dados obtidos por Katiyar *et al.* (2017), onde a produtividade lipídica foi maior nos cultivos utilizando glicerol quando comparado ao cultivo controle.

Segundo Poddar; Sen; Martin (2018), a adição de nitrato de sódio em sistema de batelada alimentada, antes do seu total esgotamento no período de cultivo, é essencial para uma efetiva assimilação do glicerol por microalgas. Estes autores mencionam que em condições de esgotamento desta fonte (nitrato), a *Chlorella* sp. tem seu consumo de glicerol afetado negativamente, absorvendo apenas quantidades mínimas desta fonte de carbono. No entanto, no presente estudo foi observado que o consumo da glicerina foi menor em condições de processo conduzidos em batelada alimentada utilizando maiores concentrações de glicerina. Contudo, nos cultivos realizados com menor concentração de glicerina foi possível observar um melhor desempenho no consumo desta fonte de carbono, tanto no crescimento mixotrófico como heterotrófico. Neste sentido, a partir dos resultados observados neste estudo, bem como a partir das informações da literatura, foi possível entender a importância dos efeitos combinados de carbono e nitrogênio na produção de biomassa microalgal e, ainda, de seus metabólitos como de carboidratos, lipídios e proteínas.

Tabela 20– Produtividade volumétrica de biomassa, amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Chlorella* sp. cultivada em meio CHU em batelada alimentada com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio

Códigos	Px (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Ax (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	ASTx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Cx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Lx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Ptx (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
AlgB0	197,6±3,6 ^{c3}	7,15±1,3 ^{b2}	8,8±1,4 ^{a1}	16,9±0,1 ^{b3}	20,4±1,3 ^{ab2}	67,4±4,6 ^{b2}
AlgB11,5M	300,1±3,6 ^{b*}	14,7±0,8 ^{a*}	8,6±1,2 ^{a*}	21,7±1,4 ^{a*}	17,4±1,3 ^{b*}	111,8±4,5 ^{a*}
AlgB23M	338,9±3,7 ^{a**}	16,3±3,6 ^{a*}	7,4±1,1 ^{a*}	23,8±0,4 ^{a*}	26,4±0,4 ^{a**}	69,0±4,6 ^{b*}
AlgB46M	207,8±3,7 ^{c*}	5,1±0,6 ^{b*}	0,3±0,0 ^{b*}	9,5±1,9 ^{c*}	11,0±3,5 ^{c*}	34,0±4,9 ^{c*}
AlgB11,5H	297,0±1,3 ^{2*}	13,1±2,3 ^{1*}	6,3±0,4 ^{1*}	20,5±0,0 ^{2*}	18,0±0,2 ^{2*}	94,6±3,3 ^{1**}
AlgB23H	412,2±3,5 ^{1*}	13,4±0,9 ^{1*}	7,1±1,3 ^{1*}	26,3±1,2 ^{1*}	47,0±1,2 ^{1*}	61,7±4,3 ^{2*}
AlgB46M	202,0±3,4 ^{3*}	4,2±0,2 ^{2*}	0,6±0,2 ^{2*}	11,7±0,0 ^{4*}	11,5±2,3 ^{3*}	30,7±4,8 ^{3*}

AlgB0: cultivo controle com ausência de glicerina e 0,250 g L⁻¹ de NaNO₃. AlgB 11,5M, AlgB 23M e AlgB 46M para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições mixotróficas, respectivamente. AlgB 11,5H, AlgB 23H e AlgB 46H para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições heterotróficas, respectivamente. Px: Produtividade volumétrica de biomassa. Ax: Produtividade volumétrica de Amido. ASTx: Produtividade volumétrica de AST. Cx: Produtividade volumétrica de carboidratos totais. Lx: Produtividade volumétrica de lipídios. Ptx: Produtividade volumétrica de proteínas. Letras, números e asteriscos sobrecritos não semelhantes em uma mesma coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 21 – Produção de biomassa e teores amido, AST, carboidratos totais, lipídios e proteínas de *Chlorella* sp. cultivada em meio CHU em batelada alimentada com adição de diferentes concentrações de glicerina e nitrato de sódio

Códigos	Biomassa (g L ⁻¹)	Teor de Amido (%)	Teor de AST (%)	Teor de Carboidratos totais (%)	Teor de Lipídios (%)	Teor de Proteínas (%)
AlgB0	1,5±0,0 ^{c3}	3,6±0,7 ^{b1}	4,5±0,8 ^{a1}	8,5±0,1 ^{a1}	10,3±0,8 ^{a1}	51,8±3,4 ^{a1}
AlgB11,5M	2,4±0,0 ^{b*}	4,9±0,2 ^{a*}	2,9±0,3 ^{b*}	7,2±0,4 ^{a*}	5,8±0,5 ^{b*}	37,3±1,4 ^{b*}
AlgB23M	2,7±0,0 ^{a**}	4,8±1,8 ^{a*}	2,2±0,3 ^{b*}	7,0±0,1 ^{a*}	7,8±0,0 ^{ab**}	20,3±1,7 ^{c*}
AlgB46M	1,6±0,0 ^{c*}	2,5±0,3 ^{c*}	0,1±0,0 ^{c*}	4,6±1,0 ^{b*}	5,3±1,7 ^{b*}	16,4±2,8 ^{c*}
AlgB11,5H	2,3±0,0 ^{2*}	4,4±0,8 ^{1*}	2,1±0,1 ^{2*}	6,9±0,0 ^{2*}	6,0±0,1 ^{2*}	31,9±1,2 ^{2**}
AlgB23H	3,2±0,0 ^{1*}	3,3±0,2 ^{1*}	1,7±0,3 ^{2*}	6,4±0,2 ^{23*}	11,4±0,3 ^{1*}	14,9±3,3 ^{3*}
AlgB46M	1,6±0,0 ^{3*}	2,1±0,0 ^{2*}	0,3±0,1 ^{3*}	5,8±0,1 ^{3*}	5,6±1,1 ^{2*}	15,2±2,0 ^{3*}

AlgB 0: cultivo controle com ausência de glicerina e 0,250 g L⁻¹ de NaNO₃, AlgB11,5M, AlgB23M e AlgB46M para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições mixotróficas, respectivamente. AlgB11,5H, AlgB23H e AlgB46H para os cultivos contendo 11,5, 23 e 46 g L⁻¹ de glicerina e 0,683g, 1,366 e 2,732 g L⁻¹ de NaNO₃ em condições heterotróficas, respectivamente. Letras, números e asteriscos sobrescritos não semelhantes em uma mesma coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O gênero de microalgas *Chlorella* apresenta inúmeras espécies que vem despertando interesse mundialmente em escala comercial, pois são amplamente empregadas na produção de produtos farmacêuticos, suplementos alimentares e rações animais. Esse gênero tem destaque principalmente pelo seu elevado teor de proteínas em sua composição, podendo conter em torno de 50% (SATHASIVAM *et al.*, 2017). Os resultados encontrados neste trabalho, evidenciaram que a microalga estudada também foi capaz de produzir até 52% (AlgB0) de proteínas, corroborando com o obtido por SATHASIVAM *et al.* (2017). Em se tratando da produtividades em proteínas foi observado os maiores valores nas seguintes condições: Alg23M: $146,1 \pm 3,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no cultivo em batelada simples e AlgB11,5M: $111,8 \pm 4,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no cultivo em batelada alimentada (Tabela 20). Este fato demonstra que as condições de cultivo dos bioprocessos estudos podem auxiliar em melhores resultados de interesse na produção de biocombustíveis, bem como para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e outras.

Segundo Xie *et al.* (2017) as proteínas estão envolvidas no crescimento, recuperação e manutenção das células, assim como em atividades reguladoras e de proteção das microalgas, representando em média, 42 a 58% da composição da biomassa seca microalgal, sendo destas, 20% presentes na parede celular, 50% internamente e 30% migram de dentro para fora da célula.

Neste contexto, os resultado obtidos a partir da segunda etapa desta pesquisa, indicaram que o experimento Alg23M obteve as maiores produções de biomassa e lipídios. Sendo assim, apresentaram as melhores condições para a etapa de análise de composição dos ácidos graxos.

O perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Chlorella sp.* apresentou diferentes compostos, os quais variaram de 12 a 18 átomos de carbono (Tabela 22). Destes ácidos, foram encontrados apenas ácidos graxos insaturados, sendo destes 57,1% monoinsaturados e 42,9% de poli-insaturados.

Tabela 22– Ácidos graxos encontrados no óleo da microalga *Chlorella sp.*

Ácidos Graxos	Nomenclatura
C12:1	Ácido Láurico
C14:1	Ácido tetradecanóico
C16:1	Ácido palmítico
C17:1	Ácido margarico
C18:2	Ácido 9-octadecenoico
C18:3	Ácido 9,12- octadecadienoico
C18:4	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico

Segundo Mutanda *et al.* (2011) o óleo de microalgas é caracterizado por conter um elevado teor de ácidos graxos insaturados, com quatro ou mais ligações duplas. No entanto, ésteres metílicos de ácidos graxos com maiores graus de insaturações não são adequados para o biodiesel, uma vez que, são mais suscetíveis a oxidação durante armazenamento. No presente estudo foi observado que apenas um dos ácidos graxos apresentou quatro ligações duplas e a maioria apenas uma ligação dupla, monoinsaturados.

A qualidade do biodiesel é afetada diretamente pelo perfil de ácidos graxos presentes, uma vez que o comprimento da cadeia de carbono dos ácidos graxos e o número de insaturações afetam suas propriedades físico-químicas, como número de cetanos, estabilidade oxidativa e temperatura de entupimento a frio (WANG *et al.*, 2014). Os autores Talebi *et al.* (2013) também confirmam essa informação, e mencionam que o tipo e a quantidade de lipídios produzidos por determinada espécie de microalgas influenciam diretamente na qualidade do biodiesel a ser obtido. Segundo estes autores, a qualidade do biodiesel depende da relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, sendo que o primeiro grupo apresenta boa resistência à degradação, conferindo ao biodiesel um aumento de sua resistência à oxidação, enquanto que, os insaturados conferem melhores características de fluidez a frio.

O estudo em questão possibilitou a obtenção de dados importantes para o desenvolvimento do processo de aplicação de microalgas na produção de biocombustíveis e abriu um leque de possibilidades que geram perspectivas para futuras pesquisas. Dentre as perspectivas foi possível salientar que:

O potencial do biodiesel que pode ser obtido a partir da microalga *Chorella* em estudo não foi investigado, todavia, futuramente sugere-se que isto deva ser realizado com intuito de verificar seu potencial como substituto do diesel e, ainda para definir sua qualidade de acordo com as normas das agências de regulação.

A importância dos testes com diferentes formulações de meio de cultura para que cepas de microalgas possam ser estudadas e viabilizadas como matéria-prima para futuros biocombustíveis líquidos foi comprovada por meio dos resultados desta pesquisa, porém ainda é necessário mais esforços em torno da temática. Pois, foi possível observar que o conhecimento acerca da necessidade nutricional de cada gênero ou até mesmo de cada espécie microalgal requer mais esforço e investimentos para alcançar melhores rendimentos de biomassa, de lipídios e carboidratos em cultivos buscando baixo custo. Nesse sentido, o reaproveitamento de subprodutos que causam poluição das bacias hidrográficas e outros ecossistemas, afetando a biodiversidade da fauna e flora com descartes inadequados, se constituem em uma alternativa promissora para aumentar a produção de biomassa e

bioprodutos microalgais e ainda, contribuir para alcançar sua viabilidade econômica como matéria-prima para biocombustíveis. Nesta questão, o uso de variados substratos (resíduos e rejeitos) que possam servir de suplemento nutricional buscando maiores rendimentos do processo devem ser incentivados para os cultivos microalgais.

6 CONCLUSÃO

As microalgas coletadas foram isoladas e identificadas a nível de gênero, sendo a *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp. e *Phormidium* sp. os três gêneros analisados quanto a capacidade de produzir matéria-prima para a produção de bioetanol e biodiesel de terceira geração.

A produtividade lipídica anual da microalga *Chlorella* sp. foi maior no meio CHU com $0,7 \text{ kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, assim como a melhor produtividade anual de carboidratos totais, sendo de $1,0 \text{ kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Em contrapartida, para a clorófito *Desmodesmus* sp. a maior produtividade de lipídios foi de $0,7 \text{ Kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ utilizando o meio Closterium, e a maior produtividade de carboidratos foi observada no meio ASM1 com valores de $0,5 \text{ Kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. A cianobactéria *Phormidium* sp., embora não cultivada em outros meios de cultivo, apresentou uma produtividade lipídica e de carboidratos totais no meio CHU de $0,1 \text{ Kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e $1,0 \text{ Kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, respectivamente.

O presente estudo também demonstrou a possibilidade de utilização da glicerina, um subproduto da indústria de biodiesel, no cultivo de *Chlorella* sp. como fonte de carbono, promovendo maiores taxas de produção de biomassa e maior acúmulo de lipídios.

A melhor produtividade de biomassa foi encontrada no experimento AlgB23H, com média de $150,4 \text{ Kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e, melhor concentração de lipídios no experimento Alg23M com valores de $28,1 \text{ Kg (m}^3\text{)}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Desta forma, este estudo evidenciou que para cultivo da *Chlorella* sp., a concentração de glicerol que se mostrou mais promissora para a produção de biomassa e lipídios foi a de 23 g L^{-1} , juntamente com $1,366 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de sódio. Esses resultados demonstram que para o cultivo de microalgas do gênero *Chlorella* é importante considerar não só as fontes de carbono e nitrogênio separadamente e, sim, sua influência combinada, pois este efeito influenciou de forma positiva no crescimento e acúmulo de lipídios em regimes mixotróficos e heterotróficos.

O perfil graxo da fração lipídica da microalga *Chlorella* sp. cultivada neste trabalho apresentou diferentes ácidos graxos, os quais variaram de 12 a 18 átomos de carbono, sendo destes 57,1% monoinsaturados e 42,9% de poli-insaturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – **Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**. Pp.1-20. Rio de Janeiro, Projeto NBR 12648: 28ª reunião. 2004.

ABOMOHR, A. E.; ELADEL, H.; EL-ESAWI, M.; WANG, S.; WANG, Q.; ZHIXIA, H. E.; FENG, Y.; SHANG, H.; HANELT, D. Effect of lipid-free microalgal biomass and waste glycerol on growth and lipid production of *Scenedesmus obliquus*: Innovative waste recycling for extraordinary lipid production. **Bioresource Technology**, 249, 992. 2018.

ALMEIDA G.F. DE, ARAÚJO P. H. F. DE, FLORENTINO A. C., BEZERRA R. M. , CARVALHO J. C. T., FAUSTINO S. M. M. E FERREIRA I. M. Fatty acid ethyl esters from microalgae of *Scenedesmus ecornis* by enzymatic and acid catalysis. **Química Nova**, Vol. XY, 1-4, 200. 2017.

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação do inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, B.S. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba. Ed. FEALQ, 2º ed., p. 765-777, 1998.

ANAGNOSTIDIS K.; Geitlerinema, a new genus of ocellatoriale cyanophytes. **Plant Systematics and Evolution**, 164, 33-46 1989.

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press. 589p. 2005.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR. 2014.

ANP. 2014. Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis/ANP. Resolução ANPnº45/2014-DOU 26.8.2014. Disponível em: <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2014/agosto&item=ranp-45-2014>. Acesso em: 30 maio de 2019.

BIBI, R., AHMAD, Z., IMRAN. M., HUSSAINS, S., DITTA, A., MAHMOOD, S., KHALID, A. Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 71. 976–985. 2017.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gênero de Algas de águas Continentais do Brasil. Chave para identificação e descrição**. Ed. Rima. 2ª edição. 2006.

BLIGH, E. G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRASIL, B. S. A. F.; BRUNALE, P. P. M. **Potencial e Perspectivas da Utilização de Microalgas para Produção de Biocombustíveis**. Embrapa Agroenergia, Comunicado Técnico, 9: 1-6, 2014.

BRASIL, B. S. A. F.; SIQUEIRA, F. G., SALUMA T. F. C., ZANETTE, C. M., SPIER, M. R. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, 25: 76–89. 2017.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F.C.P. ; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 39, 90-98. 2017.

CABANELAS, I.T.D., Z. ARBIB, F.A. CHINALIA, C.O. SOUZA, J.A. PERALES, P.F. ALMEIDA, J.I. DRUZIAN, I.A. Nascimento, From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol, **Apply Energy**, 109 283–290. 2013.

CALIXTO, C.D., SANTANA, J. K. S., TIBÚRCIO, V. P., DE PONTES, L. F. B. L., SASSI, C. F. da C., CONCEIÇÃO, M. M., SASSI, R. Productivity and fuel quality parameters of lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil. **Renewable Energy**, 115: 1144- 1152. 2018.

CARNEIRO M. L. N.M., PRADELLE F., BRAGA S. L., GOMES, M. S. P., MARTINS A. R. F.A., TURKOVICS F., PRADELLE R. N.C.. Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 73 632–653. 2017.

CASSURIAGA, A. P.; FREITAS, B. C.; MORAIS, E. G.; PORCIÚNCULA, G. A.; BRACHER, E. H.; COSTA, J. A. V.; ATALA, D. I. P. Avaliação do potencial de produção de bioetanol por *Chlorella Minutissima* cultivada com pentoses como fonte de carbono. **Revista Brasileira de Biociências**.1 1-8. 2014.

CHANDRA T. S.T.; . ADIT; M. MANEESH KUMAR; S. MUKHERJI; J. MODAK; V. S. CHAUHAN; R. SARADA; MUDLIAR S. N.. Growth and biochemical characteristics of an indigenous freshwater microalga, *Scenedesmus obtusus*, cultivated in an airlift photobioreactor: effect of reactor hydrodynamics, light intensity, and photoperiod. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 2017.

CHAUDRY, S.; BAHRI, P.A.; MOHEINANI, N.R., Superstructure optimization and energetic feasibility analysis of process of repetitive extraction of hydrocarbons from *Botryococcus beaunii* – a species of microalgae. **Computers and Chemical Engineering**. 2016.

CHENG Y., ZHOU W., GAO C., LAN K., GAO Y.; QINGYUWU. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* **Journal Chemical Technology Biotechnology**; 84: 777–781. 2009.

CHEN, C.-Y., K.-L. YEH, R. AISYAH, D.-J. LEE E J.-S. CHANG. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, 102, 1: p.71-81. 2011.

CHEN C-Y, ZHAO X-Q, YEN H-W, HOS-H, CHENG C-L, LEE D-J, *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, 78:1–10. 2013.

CHEN J , LI, Y , LAI, W. Application of experimental design methodology for optimization of biofuel production from microalgae. **Biomass and Bioenergy**, 64. 2014.

CHEN, H. H.; JIANG, J. G. Lipid Accumulation Mechanisms in Auto-and Heterotrophic Microalgae. **Journal of agricultural and food chemistry**, 65, 8099. 2017.

CHEN, J.; YAN, S.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Chemical and biological conversion of crude glycerol derived from waste cooking oil to biodiesel. **Waste Management**. 71, 164. 2018.

CHISTI Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**, 167:201–14. 2013.

CHOI, H.-J. E S.-W. YU. Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 29(3): 506-513. 2015.

DA SILVA G.P., MACK M., J CONTIERO. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, 27. 30–39. 2009.

DELRUE F, SETIER PA, SAHUT C, COURNAC L, ROUBAUD A, PELTIER G, FROMENT AK. An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae. **Bioresour Technology**, 111:191–200. 2012.

DEMIRBAS A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management** 49 2106–2116. 2008.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, 51 2738-2749, 2010.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, 52: 163-170, 2011.

DINIZ, G. S., SILVA, A. F., ARAÚJO, O. Q. F., CHALOUB, R. M.. The potential of microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater resources. **J Apply Phycology**, 29:821–832. 2017.

DOSHI A., PASCOE S., COGLAN L., RAINEY T. J. Economic and political issues in the production of algae-based biofuels: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 329:337-331. 2016.

DOS SANTOS, A. S.; PEREIRA JR, N.; FREIRE, D. M. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **PeerJ**, v. 4, p. 2078, 2016.

DRAGONE, G., FERNANDES, B., VICENTE, A. A., TEIXEIRA, J. A.. Third generation biofuels from microalgae. Current Research, **Technology na Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A**. 1355 a 1366p. 2010.

DUBEY, K., KUMAR, S., DIXIT, D., KUMAR, P., KUMAR, D., JAWED, A., HAQUE, S., Implication of industrial waste for biomass and lipid production in *Chlorella minutissima* under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic grown conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 176, 1581–1595. 2015

DUBOIS, M; GILLES, J.K.; HAMILTON, P. A.; REBERS, S.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356.

EBENEZER V.; MEDLIN; L. K.; JANG-SEU KI. Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae. **Mar Biotechnology**, 14:129–142. 2012.

ELOKA-EBOKA A. C., INAMBAO, F. L. Effects of CO₂ sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. **Applied Energy**, vol. 195, 1100-1111. 2017.

ELRAYIES, G. M.. Microalgae: Prospects for greener future buildings. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 81: 1175–1191. 2018.

FANÉS. I.; SÁNCHEZ, P. COMAS, A. **Contribution to the taxonomic study of the family Botryococcaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) in southern Spain**. Cryptogamie Algologie 30(1): 17-30. 2009.

FENG, X., T. H. WALKER, W. C. BRIDGES, C. THORNTON; K. GOPALAKRISHNAN. "Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. **Bioresource Technology**, 166: 17-23. 2014.

FRANCESCHINI, M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 1ªed. Editora Artmed, 2009.

GAO, Z.; MA, Y.; WANG, Q.; ZHANG, M.; WANG, J.; LIU, Y. Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489. **Bioresource Technology**, 218, 373. 2016.

GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ R.. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts From Feedstock Cultivation to End- products**. 1ed. 562p. Elsevier Ltd. 2017.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ L. M. , CORREA D. F. , RYANA S., JENSEN P. D., PRATT S., SCHENK P.M. Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: Towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 82 1137–1148. 2018.

GORNALL, A. G.; BORDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. The determination of protein by the biuret reaction. **Journal Biology Chemistry**, v. 177, p. 751-780, 1949.

GUIRY M.D. in GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **Algae Base**, World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2017. <http://www.algaebase.org>; searched on 25 October 2017.

HEIFETZ, P.B., FORSTER, B., OSMOND, C.B., GILES, L.J., BOYNTON, J.E.. Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses, **Plant Physiology**, 122 1439–1445. 2000.

HENTSCHKE, G.S. TORGAN, L.C. ***Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Rodriguésia* 61: 585-601. 2010.

HEREDIA-ARROYO, T., W. WEI, R. RUAN E B. HU. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials." **Biomass and Bioenergy**, 35(5): 2245-2253. 2011.

HO,S.; HUANG, S., CHEN, C.; HASUNUMA, T., KONDO. A., CHANG, J.. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock **Bioresource Technology**. 135.191–198. 2013.

HO, S.; CHANG, J.; LAI, Y.; NEN, C.; CHEN, N. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. **Bioresource Technology**, 156. 108–116. 2014.

HU, Q., SOMMERFELD, M., E. JARVIS, M. GHIRARDI, M. POSEWITZ, M. SEIBERT, E. A. DARZINS. "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances". **The Plant Journal**, 54. 4 621–39. 2008.

HU, S.; LUO, X.; WAN, C.; LI, Y. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **J. Agric. Food Chemical**, 60, 5915. 2012.

HUANG, G., FENG CHEN, WEI, D., ZHANG, X., CHEN, G. Biodiesel Production by Microalgal Biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38–46. 2010.

ILLMAN, A.M., SCRAGG, A.H., SHALES, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, 27 631–635. 2000.

ISA, Y. M., GANDA, E.T.. Bio-oil as a potential source of petroleum range fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 81: 69–752. 2018.

JAMBO, S. A., ABDULLA R., AZHAR, S. H. M., H, MARBAWI, H., GANSAU J. A., RAVINDRA P. A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 756-777. 2016.

JAYAKUMAR, S.; YUSOFF, M. M.; RAHIM, M. H. A.; MANIAM, G. P.; GOVINDAN, N.. The prospect of microalgal biodiesel using agro-industrial and industrial wastes in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 72. 33–47. 2017.

JIANG, Y.; KALODIMOS, C. G. N. M. R.; Studies of large proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 17, p. 2667–2676, 2017.

JI, F., HAO R., LIU Y., LI, G. , ZHOU, Y., DONG, R. Isolation of a novel microalgae strain *Desmodesmus* sp. and optimization of environmental factors for its biomass production. **Bioresource Technology**, 148 249–254. 2013.

JI, X.; LONG, X.; A review of the ecological and socioeconomic effects of biofuel and energy policy recommendations. **Renewable and Sustainable Energy**, Rev 2016.

JOHN, R. P., ANISHA, G.S., NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A.. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, 102 186–193. 2011.

KATIYAR, R., GURJAR, B. R., RANDHIR K. B., KUMAR, A., BISWAS, S., PRUTHI, V. Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. **Renewable Energy**, 113 1359-1365. 2017.

KHAJEPOUR F.; HOSSEINI S. A.; NASRABADI R. G.; MARKOU G.. Effect of Light Intensity and Photoperiod on Growth and Biochemical Composition of a Local Isolate of *Nostoc calcicola*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 2015.

KIM, S.; PARK, J. E.; CHO, Y. B.; HWANG, S. J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource technology**, 144, 8. 2013.

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

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J.; Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable Energy**, 52, 1834. 2015.

KOMÁREK, J. AND K. ANAGNOSTIDIS. **Cyanoprokaryota, Part 2: Oscillatoriales.** Süßwasserflora von Mitteleuropa, Vol. 19/2, B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, M. Schagerl (Eds). Spektrum Academic Press, Heidelberg, GE. 2005.

KOMARÉK, J. MARVAN, P. **Morphological Diff. in Natural Populations of the Genus Botryococcus (Chlorophyceae).** Archiv fuer Protistenkunde 141: 65-100. 1992.

KOMÁREK, J. ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota.** 1. Teil Chroococcales. In: Ettl, H.; Gardner, G.; Heynig, H. Mollenheuer, D. (Eds.). 1999.

KONG, W.B., YANG, H., CAO, Y.T., SONG, H., HUA, S.F., XIA, C.G.. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Food Technology Biotechnology**. 51. 62–69. 2013.

KOSINKOVA, J.; DOSHI, A.; MAIRE, J.; PADOVANI, G.; RISTOVSKI, Z.; BROWN, R.; RAINEY, T.J. Measuring the regional availability of biomass for biofuels and the potential for microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2015.

LAM, M. K.; LEE, K.T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673-690, 2012.

LAURENS, L. M.L., CHEN-GLASSER M., MCMILLAN J. D. A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. **Algal Research**. Volume 24, Part A, Pages 261-264. 2017.

LEITE, G.B., PARANJAPE, K., ABDELAZIZ, A.E., HALLENBECK, P.C., Utilization of biodiesel derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. **Bioresource Technology**. 184 123–130. 2015.

LI, Y., W. ZHOU, B. HU, M. MIN, P. CHEN E R. R. RUAN. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and

significance evaluation of environmental factors. **Bioresource Technology**, 102.23 10861-10867. 2011.

LI , T.T., . ZHENG, Y.B, L. YU, CHEN, S.L., Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production, **Biomass Bioenergy**, 66 204–213. 2014.

LI, Y. R.; TSAI, W. T.; HSU, Y. C.; XIE, M. Z.; CHEN, J. J. Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. **Energy Procedia**, 52, 371. 2014.

LIN, T.-S., WU, J.-Y. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. **Bioresource Technology**, 184, 100–107. 2015.

LIU J.; HUAN J. G , SUN Z. , ZHONG Y. , JIANG Y. , CHEN F.. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 102. 106–110. 2011.

LIU J, HUANG J, JIANG Y, CHEN F. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, 107:393– 8. 2012.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. Rima, São Carlos, 606 p. 2006.

LOWREY, J., BROOKS, M., MCGINN, P., Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges — a critical review. **Journal of Applied Phycology**. 27, 1485–1498. 2015.

LUANGPIPAT, T., CHISTI Y. Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae - Effects of salinity and other factors. **J Biotechnol**. 10;257:47-57.2017.

MA, X. C.; ZHENG, H. L.; MIN, M.; ANDERSON, E.; LIU, Y. H.; CHEN, P.; RUAN, R. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in wastewater with waste glycerol: Strategies for improving nutrients removal and enhancing lipid production. **Bioresource Technology**. 207, 252. 2016.

MAGRO, F. G., DECESARO, A., BERTICELLI, R., COLLA, L. M.. **Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 37, n. 1, p. 159-174, 2016.

MAHMOUD E. A.; FARAHAT L. A.; AZIZ Z. K. A.; FATTHALLAH N. A. SALAH EL DIN R. A. Avaliação do potencial de algumas microalgas isoladas para produzir biodiesel. **Egyptian Journal of Petroleum**. 24. 97-101. 2015

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

MATSUDO, M.C., MORAES, F.A., BEZERRA, R.P., ARASHIRO, R.E., SATO, S., CARVALHO, J.C.M. Use of acetate in fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira platensis*, **Annals of Microbiology**, 65.1721–1728. 2014.

MATTHEWS, ROBIN A., "Freshwater Algae in Northwest Washington, Volume II, Chlorophyta and Rhodophyta" A Collection of Open Access Books and Monographs. 1. *Western Washington University*. 2016.

MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V., OWENS, H. S. **Determination of starch and amylose in vegetables**, *Anal. Chem.* 22:1156. 1950.

MILANO, J., ONG H. C., H. H. MASJUKI , CHONG W.T., LAM M. K., LOH P. K., VELLAYAN V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 181-189. 2016.

MITRA, D., VAN LEEUWEN, J., LAMSAL, B., Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Resource**. 1, 40–48. 2012.

MOBIN, S.; ALAM, F. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. **Energy Procedia**, 510-517. 2017.

MOON, M., KIM, C.W., PARK, W.K., G. YOO, Y.E. CHOI, J.W. YANG. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*, **Algal Resource**, 2 352–357. 2013.

MORALES-SANCHEZ D., TINOCO-VALENCIA R., KYNDT J., MARTINEZ A.. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source, **Biotechnology for Biofuels**, 6. 100. 2013.

MU, J.; LI, S.; CHEN, D.; XU, H.; HAN, F.; FENG, B.; LI, Y. Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella proteoides*. **Bioresource Technology**, 185, 99. 2015

MUTANDA, T., RAMESH, D., KARTHIKEYAN, S., KUMARI, S., ANANDRAJ, A., BUX, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, 102.1, 57–70. 2011.

NAGARAJAN S, CHOU SK, CAO S, WU C, ZHOU Z. An updated comprehensive techno-economic analysis of algae biodiesel. **Bioresource Technology**, 145:150–6. 2013.

NAJAFABADI, H. A., M. MALEKZADEH, F. J., M. VOSSOUGH, G. PAZUKI, Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, 180. 311–317. 2015.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; DE SOUZA, C. O.; VICH; D. V.; DE CARVALHO, G. C.; M. A. N.. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. **Bioenergy. Resource**, 6:1–13. 2013.

NEGI, S., BARRY, A.N., FRIEDLAND, N., SUDASINGHE, N., SUBRAMANIAN, S., PIERIS, S., HOLGUIN, F.O., DUNGAN, B., SCHAUB, T., SAYRE, R. Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, 28, 803–812. 2015

PALIWAL, C.; MITRA, M.; BHAYANI, K.; BHARADWAJ, V. S.; GHOSH, T.; DUBEY, S.; MISHRA, S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, 244, 1216. 2017.

PANDEY, A.; LEE, D.; CHISTI, Y. SOCCOL, C. R. **Biofuels from Algae**. 351p. First edition. Elsevier Ltd. 2014.

PARANJAPE, K., LEITE, G.B., HALLENBECK, P. C., Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol, **Bioresource Technology**. 214. 778–786. 2016a.

PARANJAPE, K., LEITE, G.B., HALLENBECK, P.C., Strain variation in microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**. 204. 80–88. 2016b.

PEREIRA NETO A .M., DE SOUZA R. A. S., LEON-NINO A. D., DA COSTA, J. D., TIBURCIO, R. S., NUNES T. A., T DE MELLO. C. S., KANEMOTO F. T., SALDANHA-CORRÊA F. M. P., GIANESELLA S. M. F. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**. 525-53155. 2013.

PEREZ-GARCIA, O. ESCALANTE, F. M.E., BASHAN, L.E., BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45. 11-36. 2011

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics. Em: *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design* Prokop A., Bajpai R., Zappi M. (eds) **Algal Biorefineries**. Springer, cap. 61. 2015.

PODDAR, N., SEN, R., MARTIN, G. J. O.. Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth. **Algal Research**. 33 298–309. 2018.

POLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT A.. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience And Bioengineering**. Vol. 101, No. 2, 87–96. 2006.

PRIYADARSHANI, I.; RATH B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**. 3. 4: 89–100. 2012.

RASLAVIČIUS, L.; STRIŪGAS, N.; FELNERIS, M.. New insights into algae factories of the future. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 81: 643–654. 2018.

RAMOS T. EA, DOMENICALI G, BERTUCCO A. Autotrophic production of biodiesel from microalgae: an updated process and economic analysis. **Energy**, 76:807–15. 2014.

RAZZAK, S.A.; HOSSAIN, M.M.; LUCKY, R.A.; BASSI AS, D. L. H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.

RAWAT, I., R. R. KUMAR, T. MUTANDA E F. BUX. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, 88. 10. 3411-3424. 2013.

RICHARDSON J. W., JOHNSON, M. D. Economic viability of a reverse engineered algae farm. **Algal Research**, ;3:66–70. 2014.

RICHARDSON J.W., JOHNSON M. D., ZHANG X., ZEMKE P., CHEN W., HU Q. A financial assessment of two alternative cultivation systems and their contributions to algae biofuel economic viability. **Algal Research**, 4:96–104. 2014.

RÍOS, L. F., KLEIN, B.C., LUZ, L.F., MACIEL FILHO, R., WOLF MACIEL, M.R. Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp.. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 175, 469–476 . 2015.

RÍOS, L. F.; MARTINEZ, A.; KLEIN, B. C.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R.. Comparison of Growth and Lipid Accumulation at Three Different Growth Regimes with *Desmodesmus* sp. **Waste Biomass Valor**, 2017.

RISMANI-YAZDI, H., HAMPEL, K.H., LANE, C.D., KESSLER, B.A., WHITE, N.M., MOATS, K.M., ALLNUTT, F.C.T., High-productivity lipid production using mixed trophic state cultivation of *Auxenochlorella* (*Chlorella*) protothecoides. **Bioprocess Biosystem Engineering**, 38, 639–650. 2015.

ROCHA, L. G. **Cultivo de microalgas**. Dossiê Técnico. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. CETEC. 2012.

RODRÍGUEZA P. R., BORROTOA Y. S., ESPINOSAA, E. A. M., VERHELSTB S. Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from and microalgae: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 1364-0321. 2016.

SALADINI, F.; PATRIZI, N.; PULSELLI, F. M.; MARCHETTINI, N.; BASTIANONI, S. Guidelines foremergyevaluationof first, secondandthirdgeneration biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 66 221–227, 2016.

SALAM K. A., VELASQUEZ-ORTA S. B., HARVEY A. P. A sustainable integrated *in situ* transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-product-a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 1180:1196-8, 2016.

SALAMA E.; MAYUR B. K.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; EL-DALATONY, M. M.; YANG, IL-S.; MIN, B.; JEON, B. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 79, 1189. 2017.

SALAR-GARCÍA, M. J., GAJDA, I., ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M., GREENMAN, J., HANCZYC, M. M., RÍOS, A. P., IEROPOULOS, I. A. Microalgae as substrate in low cost terracotta-based microbial fuel cells: Novel application of the catholyte produced. **Bioresource Technology**, 209:380-5. 2016.

SASSI, P. G. P.; CALIXTO, C. D.; DA SILVA SANTANA, J. K.; SASSI, R.; SASSI, C. F. C.; ABRAHÃO, R. Cultivation of freshwater microalgae in biodiesel wash water. **Environmental Science and Pollution Research**, 24, 18332. 2017.

SANTANA H., CEREIJO C. R., TELES V. C., NASCIMENTO R. C., FERNANDES M. S., BRUNALE P., CAMPANHA R.C. , SOARES I. P. , SILVA F.C.P., SABAINI P. S., SIQUEIRA F.G., BRASIL B. S.A.F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology** 228. 133–140. 2017.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F., Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine, **Saudi Journal of Biological Sciences**. v 26, p.709-722. 2017.

SATYANARAYANA, K. G., MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C.. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**. Int. J. Energy Res.; 35:291 –311. 2011.

SCHMIDELL,W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda. volume 2. 2001.

SHEN Y.; PEI Z.; YUAN W.; MAO E.. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. **Int J Agric & Biol Eng** Vol. 2. No. 1. 2009.

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: Promising alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 81. 2018.

SILVA, C. E. de F., BERTUCCO A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Process Biochemistry** 51 1833–1842. 2016.

SIRAJUNNISA, A. R., SURENDRHIRAN, D. Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 248:267-251. 2016.

SIVARAMAKRISHNAN, R., INCHAROENSAKDI A. Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel. **Fuel**. 217. 458–66. 2018.

SKORUPSKAITE, V., MAKAREVICIENE, V., LEVISAUSKAS, D. Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp for biofuel production using response surface methodology. **Algal Res.-Biomass Biofuels Biopro**. 7,45–50. 2015.

SONG M., PEI H., HU W., MA G.. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology** 141 245–251 2013.

SUBHASH, G. V.; RAJVANSHI, M.; KUMAR, B. N.; GOVINDACHARY, S.; PRASAD, V.; DASGUPTA, S. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. **Bioresource Technology**. 244, 1304. 2017.

SUBRAMANIAN G., YADAV G., SEN R., Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing the carbon footprint of an algal biorefinery: a techno-economic perspective, **RSC Advances**. 6 72897–72904. 2016.

SUGANYA, T. M.VARMAN H.H.MASJUKI S.RENGANATHAN Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2016.

STANISLAV V. V., CHRISTINA G. V. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel**; 1:33-3. 2016.

SU, Y., MENNERICH, A., URBAN, B.. The long-term effects of wall attached microalgal biofilm on algae-based wastewater treatment. **Bioresource Technology**. 218 1249–1252. 2016.

SUN M., SUN J., QIU J. Characterization of the Proteomic Profiles of the Brown Tide Alga *Aureocymbra lagunensis* under Phosphate- and Nitrogen-Limiting Conditions and of Its Phosphate Limitation-Specific Protein with Alkaline Phosphatase Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, 78: 2025–2033. 2012.

TALEBI, A. F., MOHTASHAMI, S. KAV.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M., BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; H. H. MIRZAEI; MIRZAJANZADEH, M.; SHAFAROUDI, S. M.; BAKHTIARI S. Fatty acids profiling: a selective criterion for

screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TERRADO, R.; PASULKA, A. L.; LIE, A. A.; ORPHAN, V. J.; HEIDELBERG, K. B.; CARON, D. A. Autotrophic and heterotrophic acquisition of carbon and nitrogen by a mixotrophic chrysophyte established through stable isotope analysis. **The ISME journal**, 11, 2022. 2017.

ULLAH K., AHMAD M., SOFIA. Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: A review. **Fuel**, 143: 414-423. 2015.

VELJKOVIĆ, V. B.; STAMENKOVIĆ, O. S.; TASIĆ, M. B. The wastewater treatment in the biodiesel production with alkali-catalyzed transesterification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 32, 40. 2014.

VOLOSHIN R. A. , RODIONOVA M. V., ZHARMUKHAMEDOV S. K., T. VEZIROGLU N.U, ALLAKHVERDIEV S. I. Review: Biofuel production from plant and algal Biomass. **International journal of hydrogen energy** 1 e 17. 2016.

WANG, H., CHUNLI J., SHENGLI B., PENG Z., LIN C., E TIANZHONG L.. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. **Bioresource Technology**. 172. 169–73. 2014.

WANG H.; ZHOU W.; SHAO H.; LIU T.. A comparative analysis of biomass and lipid content in five *Tribonema* sp. vstrains at autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivation. **Algal Research**. 24 284–289. 2017.

WOJCIECHOWSKI, J.. STRAUBE A. CAVALCANTE K. P. MIRANDA F. E. **Isolamento e cultivo de microalgas**. Technical Report. 2013.

XIE, T. Yun Xia, Yu Zeng, Xingrui Li, Yongkui Zhang. Bioresource technology nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris* : Overcompensation strategy. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 247–255, 2017.

YEH K., CHEN C., CHANG J. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, 64. 1– 7. 2012.

YEH, K., CHANG, J.. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31 **Bioresource Technology**, 105. 120–127. 2012.

YU W., ANSARI W., SCHOEP N. G. P, HANNON M. J., MAYFIEL S. P. D; BURKART M. D.. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. **Microbial Cell Factories**, 10:91. 2011.

ZABED H., J.N. SAHU A. SUELY , A.N. BOYCEA , G. FARUQ. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Volume 71, , Pages 475-501. 2017.

ZHOU, W., WANG, H., CHEN, L., CHENG, W., LIU, T., Heterotrophy of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* for potential production of lipid and palmitoleic acid, **Bioresource Technology**, 2017a.

ZHOU, W., JINGHAN W. C,E, PAUL CHENC, CHENGCHENG JIA, QIUYUN KANGA, BEI LUA, KUN LIA, JIN LIUD, ROGER RUAN. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 76 1163–1175. 2017b.

ZHU, J.; RONG, J.; ZONG, B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal Catalysis**, v. 34, p.80–100, 2013.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 41: 1376-1384. 2015.

ZHU, L.; NUGROHO, Y. K.; SHAKEEL, S. R.; ZHAOHUA, L.; MARTINKAUPPI, B.; HILTUNEN. E..Using microalgae to produce liquid transportation biodiesel: What is next? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 78, 391. 2017.