



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Ciência e Tecnologia
Câmpus de Sorocaba

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

Ciências Ambientais

JORGE ANDRES SEGOVIA ORTEGA

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA MICROALGA *Tetrademus obliquus*
COMO FONTE PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Sorocaba

2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

Ciências Ambientais

unesp
Sorocaba

JORGE ANDRES SEGOVIA ORTEGA

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA MICROALGA *Tetradismus obliquus* COMO FONTE PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na área de concentração, diagnóstico, tratamento e recuperação ambiental.

Orientador: Prof^o Dr^o Leandro Cardoso de Moraes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Moschini Carlos

Sorocaba

2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências ambientais
unesp
Sorocaba

O77a

Ortega, Jorge Andres Segovia

Avaliação de desempenho da microalga *Tetrademus obliquus* como fonte para a produção de biodiesel / Jorge Andres Segovia Ortega. -- Sorocaba, 2021
55 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba

Orientador: Leandro Cardoso de Moraes

Coorientadora: Viviane Moschini Carlos

1. Biomassa. 2. Microalga. 3. Alga de água doce. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA MICROALGA *Tetrademus obliquus*
COMO FONTE PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL


AUTOR: JORGE ANDRES SEGOVIA ORTEGA

ORIENTADOR: LEANDRO CARDOSO DE MORAIS

COORIENTADORA: VIVIANE MOSCHINI CARLOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS AMBIENTAIS,
área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEANDRO CARDOSO DE MORAIS (Participação Virtual) 
Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp - Instituto de Ciência e Tecnologia - Câmpus de Sorocaba

Profª. Drª. JULIANA HELOISA PINÊ AMÉRICO PINHEIRO (Participação Virtual) 
Departamento de Ciências Ambientais / Universidade Brasil

Prof. Dr. YEMALL ALEXANDER MAIGUAL ENRIQUEZ (Participação Virtual) 
Universidad Cooperativa de Colombia

Sorocaba, 27 de julho de 2021

À minha família, amigos e entes queridos que me deram apoio neste longo caminho, me dando apoio e muita força para cumprir meus sonhos.

Aos meus Pais Clara e Jorge, muito obrigado pela confiança em mim, pelo apoio e pelo todo o amor que me deram o tempo todo. Aos meus irmãos Diego e David pelo apoio e a orientação.

Angie por todo o amor, apoio, compreensão durante este caminho de estudo. A Deus graças pela oportunidade de viver esta experiência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e entes queridos, por tudo o apoio e a força dada.

A meu orientador Prof^o Dr^o Leandro Cardoso de Moraes que, se dispôs a me orientar para a realização dos meus estudos e pela sua presença e ensino, também por conceder o uso do laboratório de Bioenergia.

A minha coorientadora Prof^a Dr^a Viviane Moschini Carlos, pela orientação, ajuda, presença e ensino na realização de este estudo.

A meus colegas Colombianos e Brasileiros do mestrado pela ajuda e colaboração na pesquisa.

Agradeço á UNESP por se tornar minha segunda casa, e me permitir ter ótimas experiências.

Para a fundação CEIBA e a governação de Nariño pela bolsa de estudo.

RESUMO

Devido à exploração de petróleo para a produção de hidrocarbonetos, e seu grande impacto negativo ao ambiente, sempre se estará à procura de alternativas científicas e bio-sustentáveis que podem contribuir mediante o desenvolvimento de propostas ecológicas e renováveis para a obtenção de energia de uma forma menos prejudicial para o meio ambiente. Por isso, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o rendimento de óleo obtido da microalga *Tetrademus obliquus* proveniente de a coleção de culturas de microalgas de água doce do laboratório de Ficologia Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos em meios de cultura com duas concentrações diferentes de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), 10 -5-10 % e 20-10-20% e determinar a quantidade de óleo obtido para cada meio. O experimento com a microalga durou 10 dias em condições controladas e foi feito um controle de crescimento diário para cada meio. A microalga *Tetrademus obliquus* obteve um comportamento teórico normal, o maior pico de crescimento da densidade celular em relação ao meio de cultura de NPK 10-5-10 e 20-10-20 foram de $17,794 \times 10^5$ e $35,178 \times 10^5$ células mL⁻¹ respectivamente, essa contagem celular foi feita usando uma câmara de Neubauer. O rendimento da biomassa obtida foi maior para o meio de cultura de NPK 20-10-20 com 0,26 g.L⁻¹. Em relação ao rendimento do óleo microalgal o valor obtido foi de $5,27 \pm 0.10\%$ para o meio de cultivo de NPK 20-10-20 de acordo com a metodologia de Bligh e Dyer e assistida por micro-ondas, a presença de ácidos graxos foi evidenciada mediante cromatografia gasosa, obtendo um perfil ótimo dos mesmos para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: biomassa; energia; renovável; sustentabilidade; produção; biocombustível.

ABSTRACT

Due to the exploration of oil for the production of hydrocarbons, and its great negative impact on the environment, there will always be a search for scientific and bio-sustainable alternatives that can contribute by developing ecological and renewable proposals to obtain energy in a way less harmful to the environment. Therefore, the general objective of this work was to evaluate the oil yield obtained from the microalgae *Tetrademus obliquus* from the collection of freshwater microalgae cultures of the Phycology Laboratory, Department of Botany, Federal University of São Carlos, in culture media with two concentrations different nitrogen, phosphorus and potassium (NPK), 10 -5-10% and 20-10-20% and determine the amount of oil obtained for each medium. The experiment with the microalgae lasted 10 days under controlled conditions and a daily growth control was carried out for each medium. The microalgae *Tetrademus obliquus* had a theoretical normal behavior, the highest peak of cell density growth in relation to the NPK culture medium 10-5-10 and 20-10-20 were 17.794×10^5 and 35.178×10^5 cells mL⁻¹ respectively, this cell count was performed using a Neubauer chamber. The biomass yield obtained was higher for the NPK 20-10-20 culture medium with 0.26 g.L⁻¹. Regarding the microalgal oil yield, the value obtained was $5.27 \pm 0.10\%$ for the NPK 20-10-20 culture medium according to the methodology of Bligh and Dyer and assisted by microwaves, the presence of acids fatty acids was evidenced by gas chromatography, obtaining an optimal profile for the production of biodiesel.

Keywords: biomass; energy; renewable; sustainability; yield; biofuel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da fotossíntese.....	10
Figura 2 - Fotobiorreactores utilizados no cultivo de microalgas: lagoa aberto placa delgada, tubular inclinado e continuo horizontal.....	10
Figura 3 - Fotobiorreator inicial da microalga.....	16
Figura 4 - Vista da incubadora onde foi mantida a microalga <i>Tetrademus obliquus</i>	16
Figura 5 - Diagrama esquemático do cultivo da microalga <i>Tetrademus obliquus</i>	18
Figura 6 - Gráfico dos quadrantes avaliados na câmara de Neubauer.....	19
Figura 7 - Vista das células da microalga <i>Tetrademus obliquus</i> microscópio óptico.....	19
Figura 8 - Precipitação das microalgas.....	20
Figura 9 - Microalga seca.....	21
Figura 10 – Óleo microalgal.....	21
Figura 11 - Curva de crescimento de <i>Tetrademus obliquus</i> em meio de cultura de 10-5-10 de NPK.....	22
Figura 12 - Curva de crescimento de <i>Tetrademus obliquus</i> em meio de cultura de 20-10-20 de NPK.....	23
Figura 13 - Comparação das curvas de crescimento de <i>Tetrademus obliquus</i> em os dois meios de cultura.....	24

Figura 14 - Gráfico de medias de densidade celular.....	25
Figura 15 – Cromatograma de bio-óleo extraído da microalga <i>Tetradasmus obliquus</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração tolerável de CO ₂ para várias espécies de microalgas.....	12
Tabela 2- Composição dos nutrientes nos meios de cultura.....	17
Tabela 3- Dados de a produtividade de biomassa seca do meio de cultivo 10-5-10 da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	26
Tabela 4- Dados de a produtividade de biomassa seca do meio de cultivo 20-10-20 da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	26
Tabela 5- Perfil de ácidos graxos (%) da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
3	REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1	A fotossíntese das algas.....	9
3.2	Luz.....	10
3.3	Nutrientes.....	11
3.4	Temperatura.....	13
3.5	pH.....	14
3.6	Turbulência e mistura.....	14
3.7	Transferência Gasosa.....	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Cultivo da microalga – fotobiorreactores.....	16
4.2	Preparo do meio de cultura.....	17
4.3	Delineamento experimental.....	18
4.4	Contagem Celular e curva de crescimento.....	18
4.5	Coleta e produtividade da biomassa.....	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Curva de crescimento da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	21
5.1.2	Análises estatístico da densidade celular.....	25
5.2	Rendimento de biomassa seca.....	26
5.3	Extração e rendimento de óleo.....	29

5.4 Cromatografia gasosa e perfil de ácidos graxos.....	31
6 CONCLUSÕES.....	33

1 INTRODUÇÃO

O aumento dos preços dos combustíveis fósseis, os estritos controles governamentais sobre as emissões de escape e esgotamento futuro já planejado das reservas de petróleo têm impulsionado o uso racional de energia, bem como a diversificação das fontes e suprimentos destes (MONSALVE et al., 2006; CHANDEL et al., 2007), o que levou a uma busca incessante de formas de uso de energia tecnicamente viável e economicamente atraente, como acontece com os biocombustíveis (POSSO, 2002; PELAEZ et al., 2011; VAZIRZADEH; ROBATI, 2013; HASHEM; DARWISH, 2010). A sociedade é uma grande consumidora de energia e o principal combustível é o petróleo. A crise energética de 1973 causou uma estabilização e até uma ligeira diminuição na demanda em face dos constantes aumentos no preço do petróleo bruto. Uma estratégia global de energia foi reconsiderada em diferentes países, baseia-se na promoção da eficiência e economia de energia, bem como na busca de novas fontes de energia que nos permitam reduzir a dependência atual de fontes fósseis. Os biocombustíveis, durante alguns anos, são considerados uma resposta possível, mas a sua produção através de fábricas de petróleo não pode cobrir apenas as nossas necessidades energéticas. A principal crítica diz respeito à área cultivada necessária (KHAN et al., 2012).

O cultivo de microalgas tem muitas vantagens em relação às culturas terrestres, por um lado, tem uma taxa de crescimento muito maior, e uma produção maior de petróleo do que as culturas de terra maiores, e não requer grandes áreas para produção. Além de enfrentar diretamente o risco de gerar problemas de segurança alimentar devido ao uso de culturas terrestres que são de uso alimentar, espera-se que as microalgas (biomassa) sejam uma das melhores fontes para a produção de combustíveis alternativos de terceira geração (HASHEM; DARWISH, 2010; EIA, 2004; CERON et al., 2011; KHAN et al., 2012). As energias renováveis podem ser definidas como um tipo de energia que tem uma fonte inesgotável em relação ao tempo de vida do ser humano no planeta terra e cuja utilização é tecnicamente viável. Uma alternativa é o uso de biocombustíveis, definidos como biocombustíveis líquidos ou gasosos potencialmente renováveis, que podem ser usados para a geração de eletricidade, calor e energia. Biocombustíveis como bioetanol, butanol, biodiesel, hidrogênio e metano são sintetizados a partir de fontes biológicas. (AYA et al., 2005; EIA, 2004; STEPHANOPOULOS et al., 2008).

Os biocombustíveis de primeira geração, como o biodiesel feito de óleo, representam 10,2% da oferta mundial de energia. Esses biocombustíveis são uma alternativa que impacta significativamente menos a geração líquida de CO₂ para na atmosfera (RODRIGUEZ et al., 2009). Os biocombustíveis de primeira geração, embora, têm sérias desvantagens, por um lado, a geração de matérias-primas tradicionais exige grandes extensões de terras aráveis (RAZO et al, 2007; BALAT, 2011). Também a produção destes biocombustíveis tem potenciais impactos negativos sobre o ambiente, que incluem o desmatamento e a perda da biodiversidade, a transformação dos ecossistemas naturais e perda de serviços ecossistêmicos associados a estes ecossistemas, o estabelecimento de monoculturas, o aumento das emissões de gases de efeito estufa para um possível desmatamento dos ecossistemas florestais, consumo de água e aumento da poluição e uma maior degradação e erosão do solo (CONPES de 2008; WILCOVE; KOH, 2010). Os biocombustíveis de segunda geração são obtidos utilizando materiais lignocelulósicos, que têm uma maior capacidade de produção; no entanto, eles ainda precisam de áreas férteis para o cultivo. Embora, os biocombustíveis de terceira geração, tais como os obtidos a partir de microalgas não tem nenhuma das desvantagens acima mencionadas (SANDER; MURTHY, 2010; NIGAM; SINGH, 2011; CHISTI, 2007). O biodiesel de microalgas de terceira geração é o único biocombustível renovável que tem o potencial de substituir o petróleo derivado em grande parte por combustíveis de transporte sem afetar negativamente o fornecimento de alimentos e outros produtos cultivados (GOSCH et al., 2012; HUGHES et al., 2012; LANGLOIS et al., 2012; KRAAN, 2013; WEI et al., 2013). As microalgas como fonte de biocombustíveis têm vantagens significativas sobre outras matérias primas: pois têm um crescimento mais elevado do que as plantas agrícolas utilizadas até então, além da sua utilização não compromete a produção de alimentos básicos ou de outros produtos derivados de culturas e cultivo a grande escala é viável, rentável e não ocupa terras, além de se adaptar em águas doces e salgadas (CHISTI, 2007; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

As microalgas têm várias vantagens sobre os organismos de plantas terrestres para a produção de lipídios. Por um lado, verificou-se que, para produzir a mesma quantidade de óleo obtida a partir de oleaginosas, tais como a palma Africana, a quantidade necessária de território é muito mais inferior (CHISTI, 2007). Por outro lado, as microalgas não exigem terras férteis ou em áreas de cultivos tradicionais, porque podem ser cultivadas em áreas desérticas ou baixa fertilidade, reduzindo assim o impacto sobre as culturas agrícolas para alimentação. Algumas microalgas podem até mesmo ser cultivadas em água do mar, por isso não iria competir por água potável ou com outras culturas (BALAT, 2011; CHISTI, 2007). Além disso, eles são capazes de absorver mais CO₂ do que as árvores e requer menos água do que estes últimos (BERBEROGLU et al., 2009).

A produção de biocombustíveis no mundo tem aumentou exponencialmente e se mostra como a principal oportunidade de substituição que os países desenvolvidos e emergentes têm para atender à demanda de energia e garantir o consumo interno, além de mitigar os efeitos produzidos pelos gases de efeito estufa. De acordo com informações da AIE (Agência internacional de energia), estima-se que a demanda por biocombustíveis para transporte aumentará 55% até o ano 2030 em relação ao consumo em 2004. E em relação às previsões 2012-2021 da Food and Organização das Nações Unidas para a Agricultura (FAO) e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), a produção mundial de bioetanol e biodiesel deverá dobrar, esse aumento da produção se concentrará principalmente em países como os Estados Unidos Estados Unidos, Brasil e União Europeia (UE) (GÓMEZ, 2010). De fato, esses países, Estados Unidos (33,2%), Brasil (21,8%), UE (20,6%), Argentina (4,1%), Colômbia (0,8%) (REN21, 2009) - representam a produção mundial de líquidos biocombustíveis, aproveitando essas fontes de energia de origem biológica em suas regiões para marcar o crescimento e o desenvolvimento rural, com a oportunidade de proporcionar uma nova fonte ecológica de bioenergia e, dessa forma, cumprir os compromissos de redução de GEE adquiridos no âmbito do Protocolo de Quioto (BANCO INTERAMERICANO DE DESENVOLVIMENTO, 2008).

Na América Latina, a produção de biocombustíveis é liderada por Brasil, Argentina e Colômbia, de acordo com dados do último estudo sobre biocombustíveis publicado pela Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe (CEPAL), e tornou-se a melhor opção de fonte de energia para competir com o petróleo, dados os avanços tecnológicos - combustíveis flexíveis - que esses países possuem, para abastecimento e consumo, principalmente em setores como transporte (COELHO, 2005).

Para Colômbia é importante produzir biocombustíveis, pelas seguintes razões: A redução de emissões para a atmosfera, com a mistura de apenas 10% de etanol com a gasolina irá diminuir em 27% as emissões de monóxido de carbono em carros novos, 45% em carros colombianos típicos 7-8 anos de uso e 20% de óleo, com consequências positivas para a saúde humana e ambiental. As mudanças atmosféricas são evidentes (KAFAROV et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a produção de biomassa para a geração de biocombustíveis, utilizando a microalga *Tetradismus obliquus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Instalar e manipular um fotobiorreator para o cultivo da microalga *Tetradismus obliquus*.
- Identificar o tipo de meio de cultivo ótimo para a microalga *Tetradismus obliquus*.
- Avaliar o rendimento de bio-óleo obtido para a microalga *Tetradismus obliquus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As microalgas são organismos autotróficos que realizam fotossíntese aeróbica e, com exceção de plantas terrestres (*Embriophyta*), sendo a grande maioria aquáticas. Trata-se de um grupo polifilético ou artificial (não um grupo de parentesco), e, portanto, não tem classificação na científica moderna, embora ainda útil para descrever os ecossistemas aquáticos. O estudo científico de algas é chamado Ficologia, ou também chamado de Algologia, mas também um termo ilegitimamente construído com uma raiz latina (algas) e de outros gregos (logos); ele também leva à confusão com a ciência homônima da dor, que é uma especialidade médica. Muitas "algas" são unicelulares microscópicas, outras são coloniais e algumas tem desenvolvido anatomias completas, incluindo tecidos diferenciados, com ocorre nas algas pardas. (FIDALGO et al., 1998).

As microalgas são organismos com estrutura procariótica ou eucariótica, fotoautótrofos, capazes de transformar a energia solar em energia química mediante o processo de fotossínteses, durante o processo são capazes de assimilar carbono em forma de CO₂, produzindo carboidrato e oxigênio. (NARVAEZ et al., 2004).

A função ecológica mais conhecida das algas é a produção primária, que são os principais produtores de matéria orgânica partindo da inorgânica na água, desta maneira a matéria orgânica ingressa nas cadeias tróficas. As algas consomem por adsorção de nutrientes dissolvidos de origem vegetal por outros organismos, ou por decomposição destes. existem algas em todos os ambientes aquáticos onde existe luz, algumas vezes plâncton, outras vezes bentos, porém algumas poucas espécies se encontram em ambientes terrestres úmidos.

São notáveis as algas que formam associações como simbiótica com organismos heterotróficos. Este é caso dos líquenes em associação com fungos. Também os simbiontes unicelulares encontrados em muitos animais marinhos. Existem formas unicelulares hipertermófilas, crescendo em fontes termais, entre as algas vermelhas que são de grande interesse biológico, porque está condição é única entre os organismos eucarióticos (NARVAEZ et al., 2004).

Algumas algas eucarióticas unicelulares protagonizam as vezes mais tóxicas. As algas podem ser utilizadas para produzir biocombustíveis (bioetanol, biobutanol e biodiesel), além de alimentos como em alguns países do mundo. As microalgas são protistas fotossintéticos muito eficientes conversores da energia solar devido a sua simples estrutura celular. Além disso, estas sempre estão suspensas na água, tendo um melhor e maior acesso ao CO₂ e outros nutrientes. Estas se encontram amplamente distribuídas na Biosfera adaptadas a uma grande diversidade de condições (NARVAEZ et al., 2004).

Na revisão bibliográfica das espécies de *Scenedesmus obliquus*, foi relatado por Guiry e Guiry em 2018 que a nomenclatura da mesma mudou para *Tetradesmus obliquus* (Turpin) M.J Wynne. Em 2011, Tsarenko e John discutiram as relações taxonômicas entre os gêneros *Acutodesmus*, *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. Ambos *Desmodesmus* e *Acutodesmus* foram inicialmente um subgênero de *Scenedesmus*; mais tarde, ambos foram elevados ao nível de gênero. Ao analisar as sequências de DNA ribossômico ITS-2, An e outros, em 1999, elevou *Desmodesmus* ao nível de gênero. Da mesma forma, o grupo *Acutodesmus* foi validado em 1978 como um subgênero por Hegewald; e em 2001 no nível de gênero por Tsarenko. Um total de 19 espécies e táxons infraespecíficos, reconhecidos como *Acutodesmus*, foram classificados, incluindo *Scenedesmus obliquus*. AlgaBase reconheceu *Tetradesmus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne como nome taxonômico atualmente aceito e *Scenedesmus obliquus* como sinônimo para a espécie. Autores como Di Caprio et al. (2018), Ismagulova et al. (2018), Scherbakov et al. (2018), Castillo et al. (2017), Carreres et al. (2017), Buono et al. (2016), entre outros, já reconhecem e relatam *Scenedesmus obliquus* como *Tetradesmus obliquus*.

3.1 A fotossíntese das microalgas

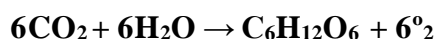
Primeiramente é preciso entender o processo fotossintético porque tem grande relação no processo de obtenção da biomassa de interesse. A fotossíntese é o processo mais importante no metabolismo das microalgas. Estas utilizam a energia solar para metabolizar o dióxido de carbono (CO_2) a carboidrato (CH_2O), libertando oxigênio molecular (O_2). As moléculas de CH_2O que constituem os blocos responsáveis pela formação de moléculas de glicose nas microalgas. A equação próxima descreve o processo universal de fotossíntese (MARTIN, 2010).

Equação 1. Fotossíntese



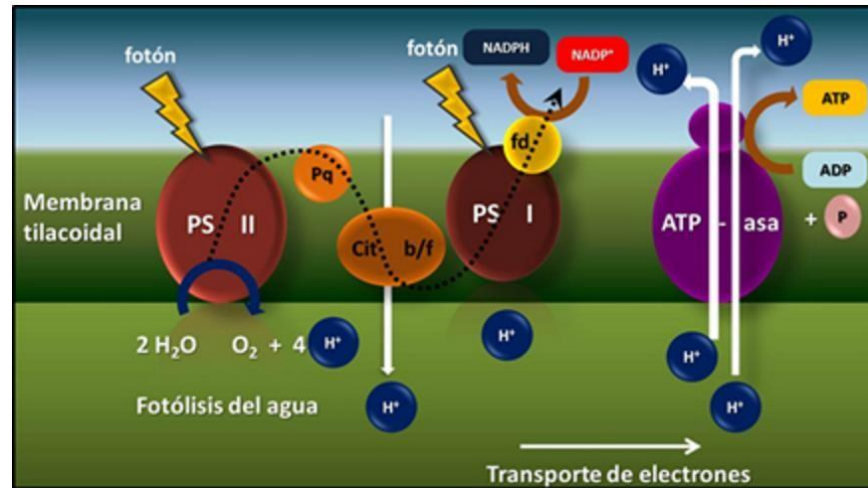
Neste processo da fotossíntese o CO_2 se metaboliza em compostos orgânicos, tais como açúcares usando a energia solar. A seguinte equação mostra que este processo de maneira geral.

Equação 2. Metabolização de compostos orgânicos



A luz é primeiramente absorvida pela antena de pigmentos do fotossistema (PS) I e II. A energia absorvida é transferida para o centro reação de clorofila: P680 no PS II e P700 PS I. A absorção de um fóton de luz por PS II remove um elétron do P680. Com a carga positiva resultante, o P680 é suficientemente eletronegativo para remover um elétron de uma molécula de água. Quando estes passos ocorrem quatro vezes, eles requerem duas moléculas de água, uma molécula de oxigênio e quatro prótons (H^+) os quais são libertados. Os elétrons são transferidos através do complexo plastoquinona ao complexo citocromo b6 / f (Pq e Cit b / f) onde se fornece a energia para a quimiossíntese. A ativação do P700 no fotossistema I pode coletar elétrons do citocromo b6/f (PC) elevando-o a um alto potencial redox que, depois de passar pela ferredoxina, é capaz de reduzir o NADP^+ a NADPH produzindo energia (Figura 1) (MARTIN, 2010)

Figura 1 - Esquema da fotossíntese

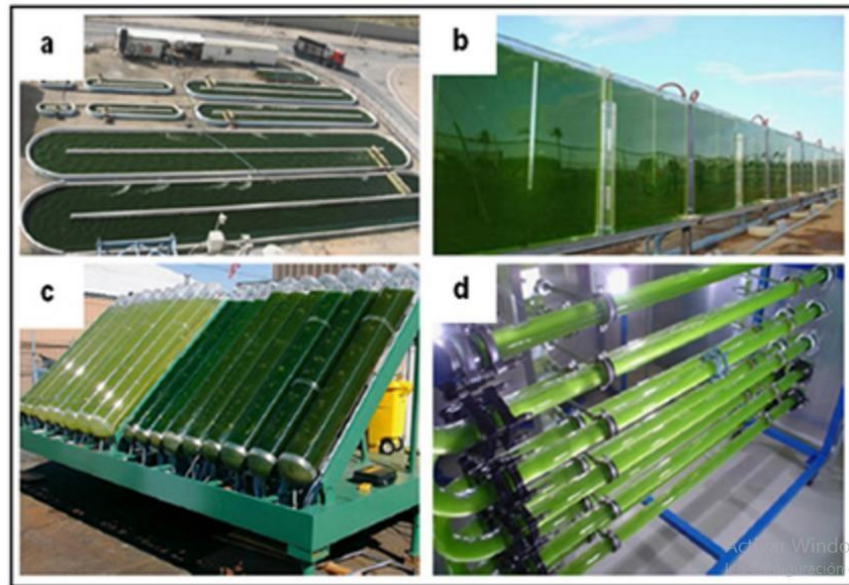


Fonte: Martin, 2010.

3.2 Luz

A intensidade da luz é um dos fatores mais importantes para o crescimento fotossintético das microalgas. Os sistemas de cultura de microalgas podem ser iluminados pela luz artificial, a luz solar ou ambos. Entre os sistemas de produção de microalgas com iluminação natural com grandes áreas de iluminação se encontram nos tanques abertos, chamados de flat plates, os **airlift** tubulares ou de tipo serpente e os de tipo inclinado entre outros (CHISTI, 2007). Os sistemas de biorreatores empregados no nível de laboratório são iluminados internamente ou externamente por luz artificial com lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (**light emitting diodes**, LED), entre outros (Figura 2).

Figura 2. Fotobiorreactores utilizados no cultivo de microalgas: (a) lagoa aberta, (b) placa delgada, (c) tubular inclinado e (d) contínuo horizontal



Fonte: Bitog et al., 2009.

Para que a luz artificial seja útil no processo fotossintético das microalgas, os fótons gerados devem encontrar-se numa longitude de onda entre 600 e 700 nm. Ao comparar diferentes fontes de luz artificiais, incluindo a luz fria fluorescente, lâmpadas incandescentes, alógenas, AlInGaP II (fosfato de índio, gálio e alumínio, com uma longitude de onda de 643 nm) e diodos emissores de luz (diodos emissores de Ligth, diodo emissor de luz) (KOMMAREDDY; ANDERSON, 2003).

A taxa específica de crescimento de microalgas depende da intensidade da luz. O crescimento de microalgas aumenta com o aumento da intensidade luminosa. Quando a taxa de crescimento atinge o ponto máximo, está diminui com o incremento da intensidade da luz, devido à foto inibição (BOHNE; LINDEN, 2002). Este padrão de crescimento em relação com a intensidade da luz se dá na maioria das espécies de microalgas. (FÁBREGAS et al., 1998). Se tem reportado que a produção e acumulação de metabólitos de interesse comercial se vê afetada pela radiação de luz branca em algas, fungos e bactérias (MARTIN, 2010). No entanto, a intensidade e regime da iluminação variam com o tipo de microalgas

3.3 Nutrientes para a microalga

O CO₂ é a fonte de carbono mais amplamente utilizada para as microalgas. Quando consumido o carbono, o oxigênio é produzido por fotólise da água, e este é diluído no meio da cultura (MOLINA et al., 1999). Embora as microalgas possam viver sobre altas concentrações de dióxido de carbono, os gases de efeito estufa, o dióxido de nitrogênio e contaminantes na atmosfera (a partir de diversas fontes) podem ser nutrientes suficientes para as microalgas (VAN BEILEN, 2010). Na Tabela 1 mostra-se a tolerância de CO₂ para diferentes espécies de microalgas, onde se observa que algumas espécies como *Tetraselmis sp.*, *Chlamydomonas sp.*, e *Nannochloris sp.* Precisam uma quantidade menos ao 15% de CO₂ para seu crescimento, enquanto que as espécies tais como *Scenedesmus sp.* *Caldário Cyanidium* toleram concentrações desde 80 até 100%, respectivamente (ONO; CUELLO, 2003).

Tabela 1 - Concentração tolerável de CO₂ para várias espécies de microalgas

Espécies	Tolerância máxima da concentração de CO ₂
<i>Cyanidium caldarium</i>	100%
<i>Tetranedesmus Obliquus</i>	80%
<i>Chlorococcum littorale</i>	60%
<i>Synechococcus elongatus</i>	60%
<i>Euglena gracilis</i>	45%
<i>Chlorella sp.</i>	40%
<i>Eudorina sp.</i>	20%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	15%
<i>Nannochloris sp.</i>	15%
<i>Chlamydomonas sp.</i>	15%
<i>Tetraselmis sp</i>	14%

Fonte: Ono; Cuello, 2003.

O CO₂ é a fonte de carbono para os organismos autotróficos, tais como algas e plantas; contudo, estima-se que anualmente as plantas vasculares só fixam apenas o 10% do que fixam as microalgas (BERBEROGLU et al., 2009). Aproximadamente o 50% da biomassa de algas em peso seco é o carbono (C); por conseguinte, para produzir 100 kg de biomassa seca, está fixa cerca de 183 kg de CO₂. O CO₂ deve ser constantemente alimentado durante as horas de luz e pode ser obtido diretamente das indústrias que queimam combustíveis fósseis. No entanto, um excesso de CO₂ em meio da cultura das microalgas afeta negativamente o desempenho das mesmas, causando, assim, uma diminuição drástica do pH do meio da cultura quando ela não tem misturas tampões (CHISTI, 2007; CONVERTI et al., 2009; HO et al., 2011.).

Estima-se que o teor de CO₂ no ar é de cerca de 392 ppm (NOAA, 2012); ao usar ar enriquecido de CO₂ em valores perto de o 2% a quantidade de lipídios que podem produzir as microalgas como *Tetrademus*, *Chlorella* ou *Nannochloropsis* pode ser aumentada até 12, 8 ou 5 vezes, respectivamente, (CHEN et al., 2011). O bicarbonato de sódio e sais similares podem também ser empregados como fontes de carbono; embora, esses sais são tipicamente mais custosos do que o CO₂ gasoso (SUH; LEE, 2003). As microalgas necessitam de nutrientes em dissolução. Os nitratos e fosfatos são dois nutrientes importantes, tais como o sódio e os silicatos. Existem vários meios de cultura formulados disponíveis, mas os requerimentos são distintos para cada variedade de microalga. Por outro lado, leva-se em conta o objetivo do experimento para definir a composição do meio de cultura. Por exemplo, se a finalidade é uma alta produtividade de biomassa (g L⁻¹), altas concentrações de nitratos e fosfatos são essenciais para o crescimento (GARCIA et al., 2006).

3.4 Parâmetro de Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento e desenvolvimento dos organismos vivos. O crescimento de microalgas depende também da temperatura, por isso, é necessário conhecer um intervalo para uma taxa de crescimento máximo. Os sistemas fotossintéticos sempre geram calor por causa da ineficiência da fotossíntese para converter a energia da luz em energia química (BHOLASE, 2004). A conversão teórica de luz vermelha em energia química é de 31% e os restantes 69% é perdida na forma de calor. Portanto, a quantidade de resfriamento num sistema de cultura, dependerá da intensidade da luz e da concentração das células, no entanto, o arrefecimento do fotobiorreator é apenas utilizado em sistemas fechados (ANDERSEN, 2005).

A temperatura também é importante para a dissociação das moléculas de carbono, tornando-o disponível para a fotossíntese (KOMMAREDDY; ANDERSON, 2003). A temperatura influencia na respiração e na fotorrespiração de modo mais acentuado do que na fotossíntese. Embora, se o CO₂ ou luz é um fator limitante para a fotossíntese, a influência da temperatura resulta insignificante (PULZ, 2001). A temperatura ótima para o crescimento de microalgas é geralmente entre 20 e 24 °C, no entanto, estes podem variar, dependendo do meio de cultura, as espécies e a estirpe utilizada. Normalmente, as culturas de microalgas toleram temperaturas entre 16 e 27 °C, em que as temperaturas inferiores a 16 °C diminuem o crescimento, enquanto que uma maior temperatura aos 35 °C torna-se letal para um grande número de espécies (MEHLITZ, 2009).

3.5 Parâmetro pH

Microalgas têm diferentes requerimentos do pH para seu crescimento, os níveis de pH alcalino, a disponibilidade de CO₂ pode ser um fator limitante para o crescimento e fotossíntese das microalgas. A faixa de pH para a maioria das microalgas é entre 7 e 9 com um intervalo ótimo de 8,2-8,7. Um pH ótimo na cultura é geralmente mantido graças à aeração com ar enriquecido com CO₂. No caso de culturas de alta densidade celular, a adição de dióxido de carbono corrige um aumento no pH, que pode atingir um valor limite de 9 para o crescimento de microalgas. Alguns autores concordam que o crescimento de microalgas é ótimo num pH neutro de 7,5 (LINDEN; HARTMUT, 2001; DEL RIO et al., 2007; MARTIN, 2010). De um modo geral, as soluções tampão são adicionadas aos meios da cultura, com a finalidade de ajustar e manter o pH do meio (ANDERSEN, 2005). O pH aumenta à medida que a idade da cultura é maior, isto é, devido à acumulação de minerais e a oxidação de nutrientes. Portanto, recomenda-se que o pH inicial do meio de cultura se encaixe num 6.5 antes de ser inoculado (MARTIN, 2010).

3.6 Turbulência e mistura

Para qualquer tipo de reator utilizado no cultivo de microalgas, uma mistura eficaz deve ser fornecida com o fim de produzir uma dispersão uniforme das microalgas no meio do cultivo, eliminando assim os gradientes de concentração de luz, os nutrientes (incluindo CO₂) e a temperatura.

CONTRERAS et al., (2003) destacam o principal problema no crescimento de algas é por danos celulares causados pelo estresse hidrodinâmico devido ao alto fluxo de água que causa um corte no nível micro celular. Sabe-se que o excesso da agitação mecânica provoca turbulência, o que pode causar danos permanentes à estrutura celular que afeta o crescimento e a produção do metabólito. Em contraste, a agitação insuficiente provoca sedimentação e morte celular. Aumentar a taxa de crescimento de algumas espécies de microalgas quando a turbulência é incrementada, é devido à melhoria de luz e CO₂. No entanto, a níveis mais elevados de turbulência, o crescimento é diminuído drasticamente, aumentando simultaneamente a velocidade superficial do gás causando um possível dano celular (CONTRERAS et al., 2003).

Os sistemas de mistura de gases ou os sistemas de colunas de misturas de bolha causar menor dano que os sistemas de agitação mecânica. Isto só para o caso das unidades de bomba de ar, em que a mistura é conseguida pelo fluxo de líquido que se obtém pela aspersão de ar para ao centro do tubo interior, diminuindo a densidade celular do líquido provocando que este suba. O líquido flui para baixo através do tubo exterior, criando, assim, uma circulação natural. Embora estes sistemas possam causar menos danos celulares, não estão isentos de esforço cortante causando danos celular em menor grau (GUDIN; CHAUMONT, 1991).

Barbosa et al., (2004), relataram a formação de bolhas no difusor como o fator principal que conduz à morte celular. Finalmente, foi relatado o efeito de sombreamento mútuo, que envolve o movimento de células contínuo desde e para as áreas de luz e escuridão. Este efeito é considerado essencial para garantir alta produtividade de biomassa (DEGEN et al., 2001; CONTRERAS et al, 2003; MARTIN, 2010).

3.7 Transferência Gasosa do crescimento celular

Quase o 50% da biomassa de microalgas se compõem de carbono (Becker, 1994), desta forma, o elemento é um componente importante para o crescimento celular. Quando se cultivam fotoautotroficamente, todas as microalgas utilizam as fontes inorgânicas de carbono para sintetizar compostos orgânicos. Apesar de que as microalgas são capazes de usar carbono inorgânico em várias formas (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- e CO_3^{2-}), estudos detalhados sobre a influência da fonte de carbono na produtividade (biomassa) das microalgas indicam que, embora o HCO_3^- é facilmente absorvido pelas células, esta é uma fonte pobre de carbono em relação ao CO_2 (MARTIN, 2010). Na verdade, é possível obter uma resposta linear na biomassa de carbono com o aporte de massa de carbono (correspondendo a um rendimento de quase 100%) isto só acontece com entradas limitada de carbono inorgânico e categorias estreitas de pH. Para os cultivos de microalgas se emprega ar enriquecido com CO_2 como aporte nutricional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo da microalga – fotobiorreactores

Neste trabalho foi utilizada uma espécie de microalga *Tetradismus obliquus*, proveniente de a coleção de culturas de microalgas de água doce do laboratório de Ficologia Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos e cultivada no laboratório de Bioenergia e materiais poliméricos (Sorocaba/Unesp) em três erlenmeyers de 1 litro, em sistema estático “batch” (figura 4).

Antes da cultura em cada fotobiorreator, 10 mL da microalga foram deixados em 1 erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de água destilada e com uma quantidade de 0.5% de NPK e micronutrientes, sem aeração e com fotoperíodo de 12 horas luz (LARANJEIRA, 2018) (Figura 3).

Figura 3. Fotobiorreator inicial da microalga *Tetradismus obliquus*



Fonte: Acervo pessoal.

Após isso a microalga foi cultivada em erlenmeyers de 1 litro dentro de uma incubadora em qualidades assépticas, foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos y 15 psi, num sistema com condições artificias de temperatura, aeração e iluminação.

Figura 4. Vista da incubadora onde foi mantida a microalga *Tetrademus obliquus*.



Fonte: Acervo pessoal.

A temperatura foi mantida entre 23 ± 2 °C, sendo iluminada com lâmpadas fluorescentes na intensidade de 507×10 lux e foto período de 12:12 h (luz: escuridão). (CONV et al., 2009; XIN et al., 2011).

4.2 Preparo do meio de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura com diferentes concentrações de NPK a primeira concentração foi de 10-5-10 e a segunda foi 20-10-20 respectivamente, anteriormente, três erlenmeyers de 1 litro. Na Tabela 2 é apresentado as diferentes composições dos meios utilizados neste estudo.

Tabela 2 - Composição dos nutrientes nos meios de cultura

Meio de cultura		
Componentes	Meio 1 (%)	Meio 2 (%)
N	10,26	20,05
P	5,26	10,11
K	10,32	20,12
Fe	0,18	0,35
S	4,25	8,75
Mg	3,06	05,95
Zn	0,0864	0,168
Cu	0,0846	0,168
B	0,0522	0,1015
Mn	0,0684	0,133
Mo	0,0018	0,0035

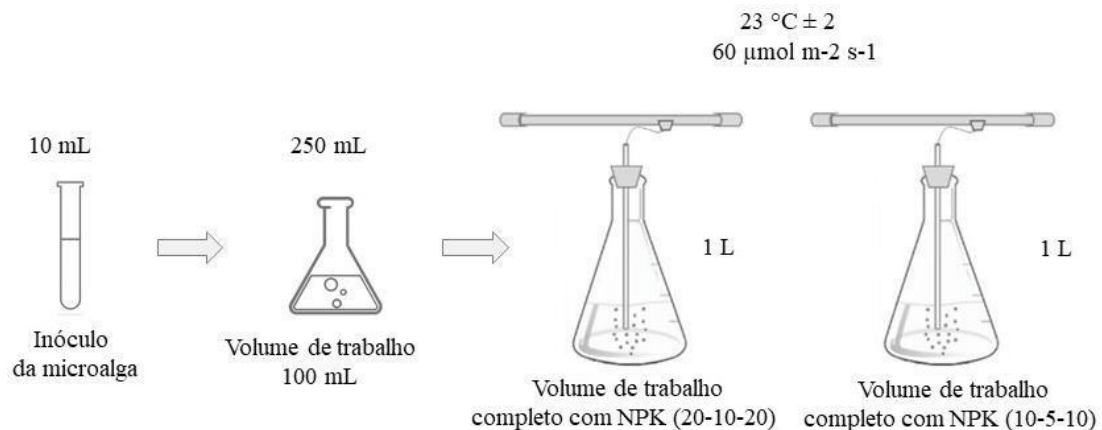
Fonte: Autoria própria.

A tabela 2 mostra a composição dos meios de cultura onde a microalga foi cultivada, meios de cultura 1 e 2 correspondentes a 10-5-10 % e 20-10-20 % em relação de NPK respectivamente. Nitrogênio, Fósforo e Potássio são considerados nutrientes limitantes para o crescimento de microalgas em aplicações biotecnológicas, e foram seletos devido á afinidade com as microalgas. Dos principais macronutrientes necessários para o crescimento algal, o nitrogênio é importante por que é constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, sendo que a abundância deste elemento no meio tende a aumentar as quantidades de proteínas e clorofilas nas células, e sua carência, tende a diminuir o pocentagem de crescimento celular. O Potássio também esteve presente em baixas quantidades nos meios NPK, mas baseado em Lourenço (2006) e Becker (1994) a quantidade de potássio não se apresenta como um fator limitante ao desenvolvimento das microalgas. O Fósforo é um nutriente necessário para o crescimento normal de todas as algas, e essencial para qualquer processo celular, atuando como transportador de substratos ou energia química, é tão importante que, pequenas quantidades no meio de cultura podem limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas (BECKER, 1994; BERTOLDI, 2008). A fim de manter um bom crescimento da microalga além de os macronutrientes NPK, foram utilizados micronutrientes descritos na tabela 2. (BERTOLDI, 2008; LOURENÇO, 2006; GROBBELAR, 2013).

4.3 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em sistema estático em triplica durante 10 dias, totalizando 3 erlenmeyers para cada meio de cultivo, uma contagem das microalgas foi feita desde o início até o fim da cultura para determinar o crescimento e estabelecer o momento em que a microalga entra na fase estacionária, o seja, o crescimento estabilizou-se. O volume inicial do inóculo utilizado para os cultivos foi de 10 mL e transferido a 1 erlenmeyer de 250 mL, após de 7 dias este inóculo foi repicado em 3 erlenmeyers de 1 litro em meio NPK em duas diferentes concentrações conforme observado na Figura 5.

Figura 5 - Dia grama esquemático do cultivo da microalga *Tetradismus obliquus*.



Fonte: Autoria própria.

4.4 Contagem celular e curva de crescimento

Para avaliação da curva de crescimento de *Tetradismus obliquus* nos dois meios de cultura, alíquotas de 1 mL foram removidas diariamente cada 24 horas durante ao longo de 10 dias consecutivos 2x1 μL de uma sub-amostra foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o microscópio óptico marca Zeiss, modelo Scope A1, o resultado foi expresso em número de células mL⁻¹ x 10⁵. A taxa de crescimento (k) foi obtida utilizando as fases da curva de crescimento representada pelo número de divisões celulares por dia, através da seguinte fórmula:

Equação 3. Taxa de crescimento

$$k = (3,322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$$

Onde t = tempo; N = número de células e t₂ - t₁ = diferença entre o tempo final e inicial (GUILLARD, 1973).

O tempo de duplicação ou tempo de divisão celular ou tempo de geração, foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento, através da fórmula:

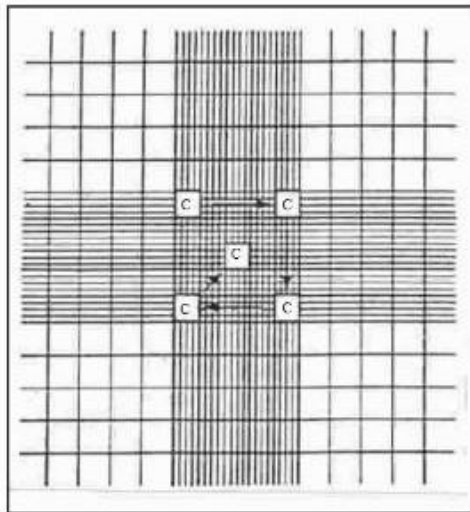
Equação 4.

$$T_d = 1/k-1$$

Onde T_d = tempo de duplicação; $1/k-1$ = divisões por dia (GUILLARD, 1973).

A contagem do número das células foi feita mediante a câmara de Neubauer como mostra a figura 6.

Figura 6. Gráfico dos quadrantes avaliados na câmara de Neubauer. **C:** quadrantes avaliados.



Fonte: Autoria própria.

Além da contagem foi tirada uma fotografia das células da microalga como mostra a figura 7.

Figura 7. Vista das células da microalga *Tetrademus obliquus* microscópio óptico (aumento de 200x).



Fonte: Acervo pessoal.

A curva de crescimento foi realizada para determinar o tempo da cultura (início da fase estacionária) no qual é apresentada a maior concentração celular das microalgas, e também determinar qual é o comportamento do crescimento da microalga.

4.5 Coleta e produtividade da biomassa

A coleta de biomassa foi realizada por precipitação por 2 dias, de modo que a maioria das microalgas permaneceu no fundo, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Precipitação das microalgas.



Fonte: Acervo pessoal.

Após a precipitação, foi realizada centrifugação para remover o máximo de água possível utilizando uma centrífuga Quimis modelo Q222TM2 ao 4000 rpm durante 15 minutos, após a amostra foi seca em mufla a 60 °C por 8 horas, o peso seco foi determinado em triplica, mediante o peso do vidro de relógio sem a microalga e depois da secagem com a microalga, como mostra a Figura 9.

Figura 9 - Microalga seca.



Fonte: Acervo pessoal.

Foi realizado o teste de comparação múltiplo (test de Tukey e Fisher) constatando diferença estatisticamente significativa entre as médias das duas amostras, obtendo um p-valor menor ao 0,05, isso mostra que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as duas distribuições com um nível de confiança de 95%, autores como Ortiz et al., (2012) usaram este tipo de testes para a comparação das medias de densidade celular em microalgas, usando o programa estatístico Statgraphics centurion 16.1.

4.6 Extração de óleo microalgal

A extração lipídica da biomassa foi realizada de acordo com a metodologia indicada por Bligh e Dyer (1959), obtendo-se um sistema miscível constituído pela água da amostra e uma mistura de clorofórmio: metanol e água. Foi pesado 1 g de amostra, em triplicata, em uma balança analítica de precisão de 0,1 mg, em seguida, 75 mL de uma mistura 2:1 (v/v) de clorofórmio e metanol foi adicionado, sendo agitado em um béquer de 250 mL. A mistura foi deixada em repouso por pelo menos 24 horas a 4 ° C e protegidos da luz, desta forma a extração dos lipídios foi favorecida evitando sua oxidação.

A amostra de microalga foi filtrada, em filtros para separar a biomassa da solução, o filtro foi lavado por no mínimo 3 vezes, com a mistura de clorofórmio e metanol. Uma vez que a mistura

solvente-microalgas foi filtrada, 2 g de carvão ativado foram adicionados ao filtrado para eliminar os pigmentos presentes na solução. Após filtração, as amostras foram acondicionadas em tubos tipo falcon e mantidas por 24 horas em até que a amostra apresentasse uma coloração amarela pálida, característica das ligações duplas presentes nos ácidos graxos. Quando os pigmentos não desapareciam, mais carvão ativado era ser adicionado (máximo 1 g), agitado em vórtex e refrigerado por mais 24 horas. A extração foi assistida por micro-ondas modelo electrolux MEX55, de 1000 W e 2450 MHz. A concentração dos lipídios totais foi determinada por gravimetria a partir do extrato de clorofórmio: metanol, evaporação em atmosfera de nitrogênio e posteriormente em estufa a vácuo até a obtenção de peso constante.

Figura 10 – Óleo microalgal da *Tetrademus obliquus*



Fonte: Acervo pessoal.

4.6.1 Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

O extrato lipídico seco foi saponificado e esterificado para obter ésteres metílicos de ácidos graxos de acordo com a metodologia indicada por Hartman e Lago (1976), seguido por cromatografia de gases.

4.6.2 Análise de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

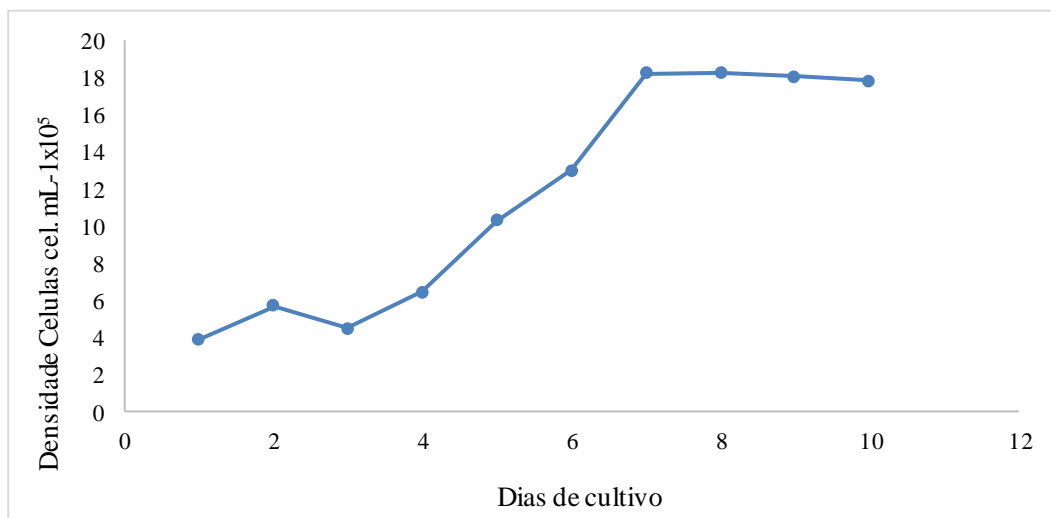
A composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, com cromatógrafo VARIAN - 3400 CX, equipado com detector de ionização e coluna DB-FFAP megabore (fase estacionária: ácido nitroterftálico modificado por polietilenoglicol) 30 m de comprimento e 0,545 mm de diâmetro, com um filme de 1 mm de espessura. O nitrogênio foi usado como gás de arraste a 2 ml.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector eram 250 °C e 270 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna era de 120 °C, mantida por 1 min. A seguir, três ajustes foram utilizados para a rampa de temperatura: 5 °C.min⁻¹ a 170 °C, mantida por 1 min; 2 °C.min⁻¹ a 190 °C, mantidos por 2 min e 5 °C.min⁻¹ até 220 °C, permanecendo nesta temperatura por 20 min. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL. Os ácidos graxos foram identificados por tempos de retenção em comparação com os padrões analisados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento da microalga *Tetrademus obliquus*.

Em relação ao crescimento da microalga os dados obtidos para o meio de cultura de 10-5-10 de NPK encontra-se na figura 11:

Figura 11 - Curva de crescimento de *Tetrademus obliquus* em meio de cultura de 10-5-10 de NPK.

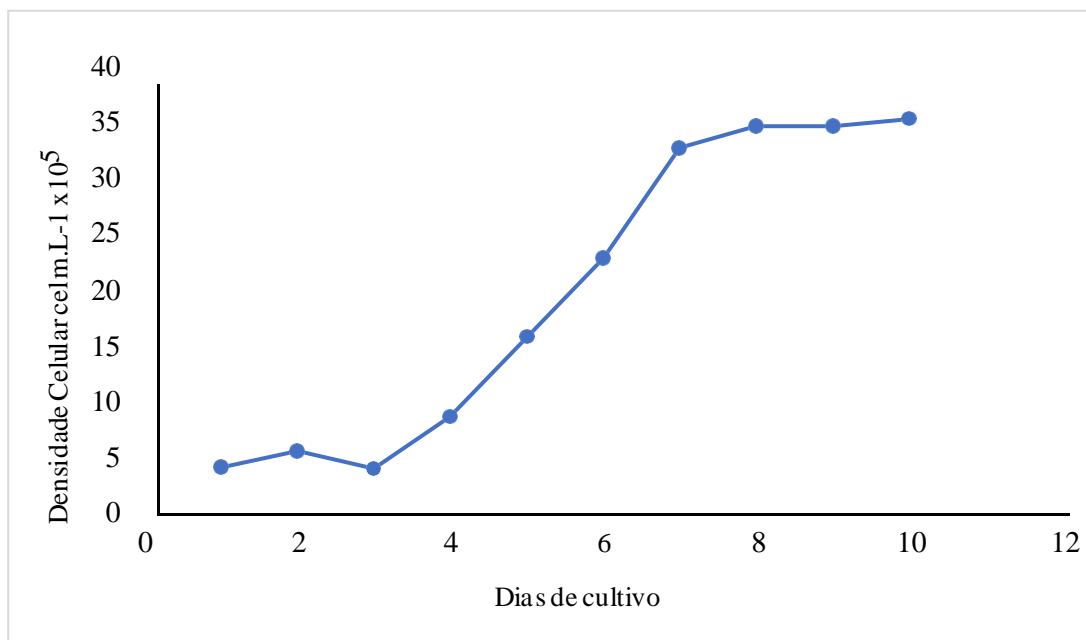


Fonte: Autoria própria.

O experimento foi finalizado com 10 dias em triplicata, onde para a microalga *Tetradismus obliquus* foi seu período de senescência, obtendo o pico maior nos dias 7 e 10, e tendo um comportamento unidirecional, os resultados concordam com Guerrero e Pozo (2013) que obtiveram um ponto de máximo crescimento no dia 7, também, autores como Andrade et al., (2019) obtiveram resultados de 12 dias para o pico maior de crescimento, a variação entre dias pode ser devido a diferentes fatores como, concentração inicial do cultivo, parâmetros de cultivo como temperatura, fotoperíodo e quantidade de nutrientes, os resultados evidenciam que a concentração nutrientes do meio de cultura 10-5-10 não contribuem na taxa crescimento da densidade celular em comparação com o obtido no outro meio de cultivo trabalhado neste estudo.

Em relação ao crescimento da microalga os dados obtidos para o meio de cultura de 20-10-20 de NPK encontra-se na figura 12

Figura 12 - Curva de crescimento de *Tetradismus obliquus* em meio de cultura de 20-10-20 de NPK.



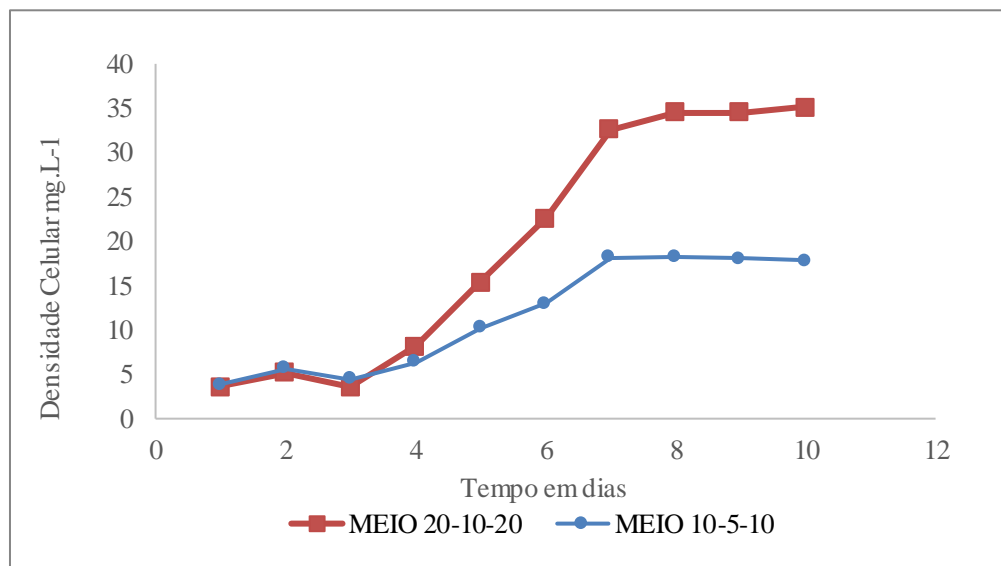
Fonte: Autoria própria.

Para os dados obtidos para o meio de cultura de 20-10-20 o maior pico de crescimento foi para os dias 7 e 10, tendo uma leve diferença entre eles, os dados obtidos concordam também com os resultados obtidos por Guerrero e Pozo (2013) que obtiveram um ponto de

máximo crescimento no dia 7, também, autores como Andrade et al., (2019) obtiveram resultados de 12 dias para o pico maior de crescimento.

Em relação ao crescimento da densidade celular, na Figura 12 se mostram os dados obtidos em comparação entre os dois meios de cultura.

Figura 13 - Comparação das curvas de crescimento de *Tetrademus obliquus* em os dois meios de cultura.



Fonte: Autoria própria.

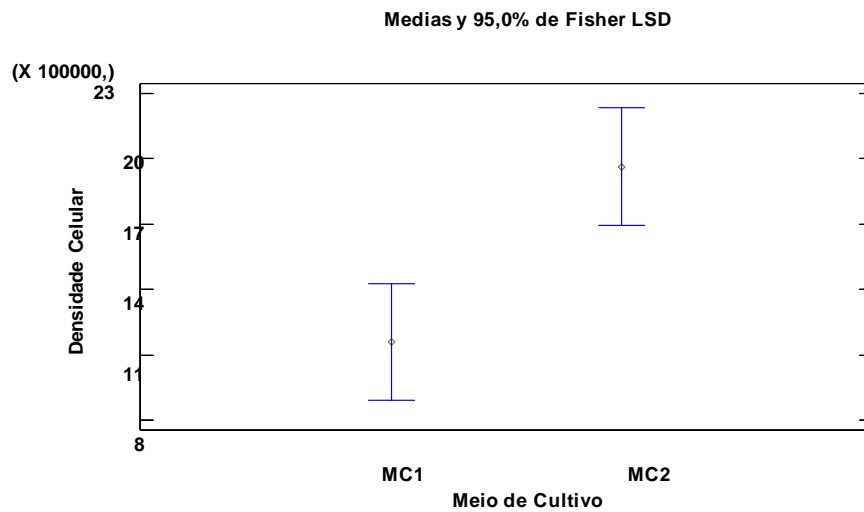
A Figura 13 mostra uma comparativa das duas concentrações utilizadas para o cultivo da microalga, os dados mostram que existe uma diferença na relação de a densidade celular entre cada meio de cultivo, evidenciando que para o meio de 20-10-20 existe uma maior concentração desde os dias 7 até o dia 10 de cultivo, obtendo para o dia 10 uma concentração celular de $35,178 \times 10^5$ células mL⁻¹, isso evidencia que a presença maior de nutrientes contribui para o crescimento celular, os dados são similares à os obtidos por Lozano e Ortiz (2019) eles obtiverem para o dia 13 uma concentração variável de $7,8 \times 10^5$ e $4,1 \times 10^6$, a variação entre e concentração celular pode ser devido a diferentes fatores como, concentração inicial do cultivo, parâmetros de cultivo como temperatura, fotoperíodo e tipo de luz, também tem relação a quantidade de nutrientes, como também o tipo de meio de cultura utilizado. As diferenças podem se dever também a os valores baixos de fósforo nos meios de cultura, este elemento evidencia que é importante para o crescimento das microalgas porque atua como

transportador de substratos. Os valores altos de nitrogênio demonstram que este elemento contribui significativamente no crescimento da microalga, sendo que este elemento participa ativamente no metabolismo primário, e abundância dele contribui a aumentar as quantidades de clorofila e proteínas nas células.

De acordo a Doran (2005), o crescimento das microalgas aumenta exponencialmente até alguns fatores começarem a esgotar. a concentração de nutrientes é um dos fatores mais importantes, pois diminui ao longo do tempo em um meio de cultivo. Uma vez consumidos todos os nutrientes, as culturas terminam morrendo. Além dos nutrientes, Tripathi *et al.*, (2015) relatam que o pH é um parâmetro ambiental importante, pois exercem influência no crescimento celular e formação de produto. O pH está diretamente ligado com o bom funcionamento celular das microalgas, por isso o seu controle é de vital importância para o melhor desenvolvimento dos cultivos, neste trabalho o pH foi mantido entre 7 e 7,2, permanecendo básico (7), e sendo o pH perfeito para o crescimento de microalga. Outro fator importante foi a temperatura, Segundo Barsanti e Gualtieri (2006), a temperatura tem impactos significativos na taxa de crescimento, no tamanho da célula e na composição bioquímica das microalgas, é de extrema importância dar atenção a este parâmetro, pois também tem efeitos na produção de biomassa, neste trabalho a temperatura foi controlada entre 21 °C e 25 °C sendo o padrão de 23 °C, os autores Barsanti e Gualtieri (2006) determinaram que temperaturas inferiores a 18°C podem desacelerar o crescimento, enquanto a temperaturas superiores a 35°C podem ser letais para a maioria das espécies de microalgas, a temperatura do cultivo usada nesta investigação foi favorável, estando dentro da faixa de temperatura adequada para o crescimento da microalga.

5.1.2 Análises estatístico da densidade celular

Figura 14 - Gráfico de Medias de densidade celular.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 14 mostra a comparação das médias para cada meio de cultivo, indicando que existe uma diferença estatística significativa entre elas, mostrando que para o meio de cultura mais enriquecido seja o de NPK 20-10-20 existe um maior crescimento da densidade celular da microalga respeito a o meio de cultura de NPK 10-5-10. Hakalin (2014), trabalhando com *Tetradismus obliquus* em diferentes meios entre eles o NPK, evidenciaram uma diferença das médias do crescimento na densidade celular entre cada meio de cultivo, alguns mais enriquecidos que outros.

5.2 Rendimento de biomassa seca

Os pesos obtidos para cada meio de cultivo em relação a microalga seca foram

Tabela 3- Dados de a produtividade de biomassa seca do meio de cultivo 10-5-10 da microalga *Tetradismus obliquus*

Medição	Peso 1	Peso 2	Peso 3
Peso da biomassa	0,11 g	0,11 g	0,13 g
Média Geral	0,116 ±0,2 g		

Tabela 4- Dados de produtividade de biomassa seca do meio de cultivo 20-10-20 da microalga *Tetradismus obliquus*

Medição	Peso 1	Peso 2	Peso 3
Peso da biomassa	0,26 g	0,26 g	0,27 g
Média Geral	0,26 ±0,2 g		

De acordo as Tabelas 5 e 6 a média geral de produtividade de biomassa seca de a microalga *Tetradismus obliquus* para cada meio de cultivo foi de 0,116 g.L⁻¹ e 0,26 g.L⁻¹ respectivamente para os meios de cultura 10-5-10 e 20-10-20, obtendo um rendimento maior para o meio de cultura mais enriquecido em nutrientes, valores parecidos foram encontrados por Baumgartner (2011), obtendo valores de 0,098 g.L⁻¹ para o meio de cultura de 10-5-10 e 0,19 g.L⁻¹ para o meio de cultura de 20-10-20 para a mesma microalga. As diferenças entre os dados obtidos neste estudo e os obtidos pelos autores podem dever-se as características em termos de composição de meio de cultivo utilizado, como também o tipo de meio de cultivo, sendo os analíticos mais restritivos em relação a quantidade de nutrientes.

Embora cada elemento tenha sua importância relativa para a nutrição algácea, não há um número exato de elementos químicos essenciais, pois certos elementos são essenciais para determinadas espécies e não são para outras. Os resultados mostram que o NKP utilizado neste estudo obteve melhores resultados, sendo estes um pouco maiores à os resultados de os autores mencionados em relação a produtividade de biomassa.

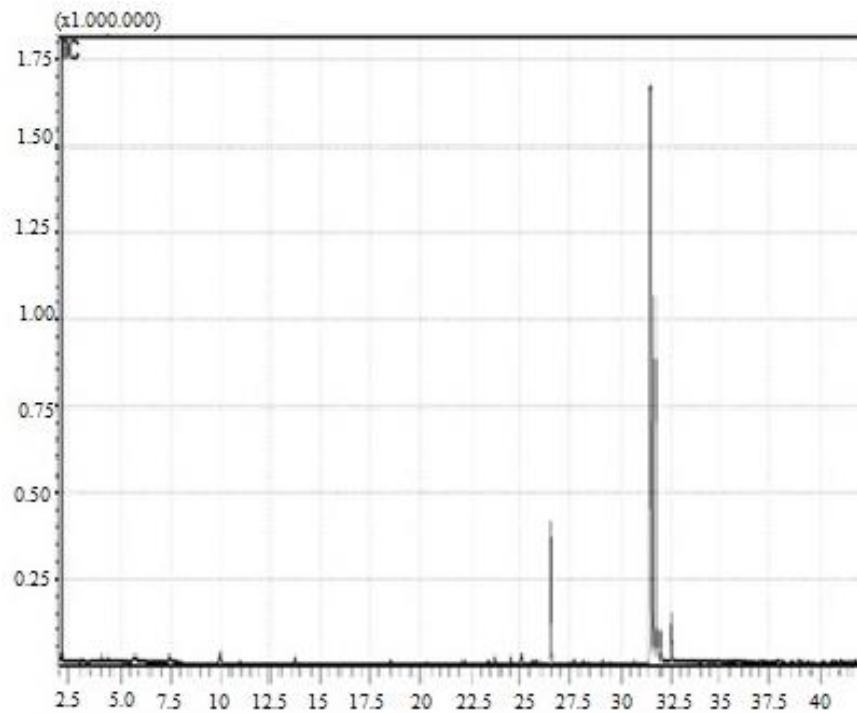
5.3 Extração e rendimento de óleo

Os resultados da obtenção do óleo da biomassa seca pelo método proposto por Bligh e Dyer (1959), para a microalga *Tetrademus obliquus* são de $5,27 \pm 0,10\%$ para o meio de cultivo mais enriquecido de nutrientes (20-10-20), estes resultados são semelhantes aos encontrados por Morais e Costa (2008) com 4,60%, a variação das condições de cultivo pode fazer a produção de lipídios variar entre 1 e 40 % (RADMANN e COSTA, 2008). Uma das condições da variabilidade é a temperatura de secagem da biomassa microalgal, está também influência o conteúdo de ácidos graxos no óleo, autores como Widjaja *et al.*, (2009) realizaram um estudo avaliando o efeito da temperatura de secagem na composição de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris*, verificaram que a temperatura de secagem da biomassa microalgal afeta tanto a composição lipídica como o teor de lipídios, a secagem por liofilização (0 °C) mantém a composição de lipídios originais das microalgas.

Em relação ao efeito do micro-ondas no óleo, morfologicamente o micro-ondas provoca uma ruptura do interior do material devido ao rápido aquecimento causado pela oscilação das substâncias polares, que dá origem a pequenos poros na membrana celular, por onde é liberado o conteúdo intracelular. Os óleos extraídos com pré-tratamento por micro-ondas não apresentam alterações ou desvantagens em termos de qualidade, em relação aos obtidos sem pré-tratamento (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2011). A eficiência do método assistido por micro-ondas pode depender de vários fatores, incluindo tempo, temperatura, razão sólido-líquido, propriedades dielétricas da mistura, tipo de concentração de solvente (MA *et al.*, 2014).

5.4 Cromatografia gasosa e perfil de ácidos graxos

Figura 15 – Cromatograma de bio-óleo extraído da microalga *Tetrademus obliquus*



Fonte: Autoria própria.

No cromatograma da amostra extraída foram identificados 4 picos (figura 15), com 90% de similaridade para a identificação dos compostos baseados em tempo de retenção, determinando-se que todos os produtos são constituídos de ácidos graxos, como esperado. Além do cromatograma, foi feito também um perfil de ácidos graxos como mostra a tabela 7 e como é o esperado os produtos diferem em quanto a composição e fração dos ácidos graxos como observado na tabela 7.

Tabela 5- Perfil de ácidos graxos (%) da microalga *Tetrademus obliquus* para o médio de cultivo 20-10-20

Composição	<i>Tetrademus obliquus</i>
Ácidos graxos saturados	
C 16:0	2,91
C 15:0	2,17
C 17:0	1,07
C 18:0	0,93
C 20:0	0,82
C 22:0	sd
C 23:0	2,31
Ácidos graxos monoinsaturados	
C 16:1	36,22
C 15:1	1,57
C 14:1	0,57
C 17:1	6,27
C 18:1	17,25
C 20:1	0,63
C 24:1	1,61
Ácidos graxos poli-insaturados	
γ - C 18:3	5,37
α - C 18:3	3,47
C 18:2	3,88
C 20:2	4,77
C 20:3	0,67
C 20:4	sd
C 20:5	sd
C 22:6	3,57
C 22:2	1,27

sd: sem detecção.

Fonte: Autoria própria.

As maiores quantidades de ácidos graxos obtidos foram C16:0 ácido palmítico com 2,91%, C16:0 ácido palmítoleico com 36,22% e γ -C 18:3 ácidos gamma-linolénico com 5,37%, os resultados são semelhantes aos obtidos por Radmann e Costa (2008), eles encontraram para o C16:0, C16:0, γ -C 18:3 valores de 3,22%, 37,01% e 5,42% respectivamente. Os resultados demonstram que a produção de biodiesel mediante microalgas pode ser viável devido a não só o conteúdo dos ácidos graxos mencionados se não também por todo o perfil em geral que demonstra que a microalga tem o perfil ótimo para a produção de biodiesel. As propriedades dos triacilglicerídeos e do biodiesel são determinadas pela quantidade de cada ácido graxo que estão presentes nas moléculas. O comprimento da cadeia e o número de duplas ligações determinam as características físicas de ambos os ácidos graxos e triacilglicerídeos (RAMOS et al., 2009). De acordo Oliveira et al., (2010), o processo de secagem é responsável pela remoção de uma ampla quantidade de água presente na biomassa das microalgas, mas a secagem pode afetar a qualidade do produto e causar oxidação lipídica. Taher et al., (2015) também reforçam em seu trabalho que a secagem pode provocar alterações nos perfis de ácidos graxos das microalgas, as ligações duplas se rompem com secagem a qual a biomassa foi submetida na extração via base seca. Também segundo Lim et al., (2012), baixos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, como os obtidos neste trabalho, são desejados para a produção de biodiesel, pois reduz a necessidade de tratamentos como a hidrogenação catalítica. A tendência reversa é observada com a EPA (ácido eicosapentaenoico) conteúdo aumenta com a temperatura, portanto, é possível obter o conteúdo das classes FAMES (éster metílico de ácido graxo) de acordo com o processo de extração usado.

7- CONCLUSÕES

A instalação e operação dos fotobiorreactores forneceu a produtividade da densidade celular como também da biomassa, o que evidencia que mantendo um ambiente controlado de condições de temperatura, luz, pH e aeração favorece o crescimento da microalga.

A utilização de o NPK como potencial meio de cultura para o crescimento da microalga *Tetradismus obliquus* mostrou ser eficiente, demonstrando que meios de cultura mais enriquecidos em nutrientes são favoráveis para a produtividade de biomassa.

Este estudo demonstrou a metodologia do Bligh e Dyer (1959), assistido com a aplicação do micro-ondas contribui na extração da biomassa seca e pode ser usado para extrair lipídios da microalga *Tetradismus obliquus*, essa extração permitiu obter bio-óleo e fazer uma caracterização do perfil do óleo, demonstrando seu potencial uso como biocombustível.

O uso de tecnologias como a liofilização pode melhorar a extração da biomassa portanto a produção de bio-óleo pode ser melhorada.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.; VERA, A.; CÁRDENAS, C.; MORALES, E. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus sp.* utilizando águas residuales de pescadería. **Revista Técnica**, 32(2), 126-135. 2009.
- ANDERSEN, R. Algal Culturing Techniques. USA. Elsevier. Cap 1:1-12, 2005.
- AYA, A.; PINEDA, C.; SÁNCHEZ, J.; CARDONA, A. Análisis comparativo de diferentes materias primas amiláceas para la obtención de alcohol carburante. **En XXIII Congreso Colombiano de Ingeniería Química**. Centro de Estudios de Ingeniería Química, Manizales, 2005.
- AMARO, H.; GUEDES, A.; MALCATA, F. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied energy**, 88(10), 3402-3410, 2011.
- ANDERSEN, O.; WEINBACH, J. Residual animal fat and fish for biodiesel production. **Potentials in Norway. Biomass and Bioenergy**, 34(8), 1183-1188, 2010.
- APPA**, El desarrollo de la obligación de biocarburantes en España: Beneficios, factores críticos y desafíos para la consolidación científica, 2007.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae-Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 1st ed. **England, Taylor e Francis Group**, 2006.
- BALASUBRAMANIAN, S.; ALLEN, J.; KANITKAR, A.; BOLDOR, D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system-desing, optimization, and quality characterization. **Bioseour. Technol.** 102(3), 3396-3403. 2011.
- BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. **Energy Conversion and Management**, 52(2), 1479–1492. 2011.
- BANCO INTERAMERICANO DE DESARROLLO (BID). BID, WASHINGTON 2008.
- BAUMGARTNER, T. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* E *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel. 2011.
- BECKER, E. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. New York: Cambridge University Press. 293 p. 1994.
- BERBEROGLU, H.; GOMEZ, P. S.; PILON, L. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella sp.* used for CO₂ fixation and biofuel production. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, 110(17), 1879-1893, 2009.
- BERTOLDI, F. C., SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. Curitiba: B. **CEPPA**. 26(1): 9-20. 2008.

- BITOG JP, LEE IB, YOOJI, HWANG SB, HONG SW AND SEO IH. Development of a large- sized photobioreactor for microalgae production. In Proceedings of the 2009 CIGR **International Symposium of the Australian Society for Engineering in Agriculture**, Brisbane, Queensland, Australia, September 13–16, 2009.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** **37**, 911-917. 1959.
- BOHNE F AND LINDEN H. (2002). Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biochimica et Biophysic Acta** **1579**: 26-34.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** **63**: 351–361, 2004.
- BUONO, S; COLUCCI, A; ANGELINI, A; LANGOLLOTTI, M; MASSA, A; MARTELLO, F. Productivity and biochemical composition of *Tetrademus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum*: effects of different cultivation approaches. *J. Appl. Phycol.* **28**:3179-3192. 2016.
- CASTANO PELAEZ, H.; CARDONA, M.; Mejia, C.; ACOSTA, A. **Ethanol production from cassava flour in simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation system.** *Dyna*, **78**(169), 158-166, 2011.
- CERON, V.; VELASCO, L.; PARDO, F. Evaluación ambiental de la producción de etanol a partir de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), **variedad M-THAI 8.** *El Hombre y la Máquina.* pp. 84-94, 2011.
- CHANDEL, A.; CHAN, E; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M.; Rao, L.; RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and molecular biology review**, **2**(1), 14-32, 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**. **26**(3): 126- 131, 2011.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3), 294-306, 2007.
- CONTRERAS-FLORES, C.; PEÑA-CASTRO, JM.; FLORES-COTERA, LB. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. **Interciencia** **8**: 450-456, 2003.
- CORTES, M.; GONZALES, S.; ALVARES, M. Colombia en la era del alcohol carburante. **Revista CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Vol. (3). ISSN 1900-9607/. pp. 13, 2008.
- CONPES. CONPES 3510 Lineamientos de política para promover la producción sostenible de biocombustibles en Colombia. Bogotá: **Departamento Nacional de Planeación**, 2008.
- COELHO S. Biofuels — Advantages and Trade Barriers. United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), 2005.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of

Nannochloropsis oculata and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 48(6), 1146-1151, 2009.

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

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*. Springer Science & Business Media, 2010.

DEL RÍO, E.; ACIEN, G.; GARCIA-MALEA, G.; RIVAS, J.; MOLINA-GRIMA, E.; GUERRERO MG. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and Bioengineering** 74: 397-402, 2007.

DEGEN, J.; UEBELE, A.; RETZE, A.; SCHMID-STAIGER, U.; TROSCHE, W. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. **Journal of Biotechnology** 92: 89-94, 2001.

DI CAPRIO, F.; WIJFFELS, D.; VAN DER VEEN, D. Quantification of *Tetrademus abliquis* (Chlorophyceae) cell size and lipid content heterogeneity at single-cell level. **J. Phycol.** 54, 187-197. 2018.

DOAN, T. T.; SIVALOGANATHAN, B.; OBBARD, J. P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, 35(7), 2534-2544, 2011.

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. 1^o Ed. London, **Academic Press Limited**, 2005.

EIA, R.; Alcohol carburante: **actualidad tecnológica**. pp.39-46, 2004.

ENCINAR, J.; SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ, G.; GARCÍA, L. Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. **Bioresource Technology**, 102, 10907-10914, 2011.

FABREGAS, J.; GARCIA, D.; MORALES, E.; DOMINGUEZ, A.; OTERO, A.; Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. **J. Ferment. Bioeng.** 86, 477-481, 1998.

FANNY, A.; ABERT-VIANA, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource technology**, v. 114, p. 457-465, 2012.

FIDALGO, J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, 166(1-2), 105-116, 1998.

GARCÍA-MALEA, MC.; ACIÉN, FG.; FERNÁNDEZ, JM.; CERÓN, MC.; MOLINA E, Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. **Enzyme and Microbial Technology** 38: 981-989, 2006.

- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, 21(5), 493-507, 2009.
- GUDIN, C.; CHAUMONT, D. Cell fragility-key problem of microalgae mass production on closed photobioreactors. **Bioresource Technology** 38, 145–151, 1991.
- GUIRY, M.D; GUIRY, G.M. AlgaeBase. National University of Ireland, Galway. 2008.
- GOSCH, B.; MAGNUSSON, M.; PAUL, N.; DE NYS, R. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. **Gcb Bioenergy**, 4(6), 919-930, 2012.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 36(2), 269-274, 2009.
- GÓMEZ, D. P. Suramérica y la seguridad energética: Una visión a la luz del sistema político internacional. *Díkaion*, 19(1), 195–217. 2010.
- GROBBELAR, J. Inorganic algal nutrition. In: A. Rhichmond, and Q. Hu, editors, Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. **John Wiley y Sons**, Ltd. GBR. p. 123-133. 2013.
- GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements, London: **Cambridge University Press**. p. 289-311, 1973.
- GUERRERO, P.; PATRICIO, V.; POZO CASTRO, A. C. Evaluación del rol de la iluminancia, el ph y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* En condiciones de laboratorio (**Bachelor's thesis**), 2013.
- HASHEM, M.; DARWISH, S. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and bioenergy**, 34(7), 953- 959, 2010.
- HAKALIN, N. L. S. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* para a produção de biodiesel. 77-78. 2014.
- HACKENBERG, N. Biocombustibles de segunda generación. **Revista Virtual REDESMA**, 4: 49-61, 2008.
- HAKALIN, L. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* para a produção de biodiesel. 2014.
- HEGEWALD, E; DYER, J. Phylogenetic relationship of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparasons. *Plant Syst. Evol.* 241: 185-197 pp. 2003.
- HO, S.H.; CHEN, CY.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Perspectives on microalgae CO₂- emission

mitigation systems – a review. **Biotechnol. Adv.** 29, 189–198, 2011.

HUGHES, A.; KELLY, M.; BLACK, K.; STANLEY, M. Biogas from Macroalgae: is it time to revisit the idea?. **Biotechnology for biofuels**, 5(1), 86, (2012).

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Ethanol Production from Waste Potato Mash by Using *Saccharomyces Cerevisiae*. **Applied Sciences**, Vol. 2(4). pp. 738-753, 2012.

KHAN, R.; NAWAZ, A.; AHMED, M.; KHAN, M.; AZAM, F., ULLAH, S.; KHAN, N. Production of bioethanol through enzymatic hydrolysis of potato. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 11(25). pp. 6739-6743, 2012.

KAFAROV, V.; OJEDA, K.; SÁNCHEZ, E. Situación y perspectiva de biocombustibles en Colombia. **Proceedings of the 6.** Encontro de Energia no Meio Rural. (2006).

KRAAN S. Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1): 27–46, 2013.

KOMMAREDDY, AR.; ANDERSON, GA. Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). **ASAE Paper** No. 034057. ASAE, St. Joseph, Michigan, 2003.

KOMMAREDDY, AR.; ANDERSON, GA. Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). **ASAE Paper** No. 034057. ASAE, St. Joseph, Michigan, 2003.

LARANJEIRA, G. avaliação da microalga *ankistrodesmus gracilis* (reinsch) korshikov cultivada em meio de macrófita na alimentação de *xiphophorus maculatu*. **dissertação de mestrado**. 22-23. 2018.

LANGLOIS, J.; SASSI, J.; JARD, G.; STEYER, J.; DELGENES, J.; HÉLIAS, A. Life cycle assessment of biomethane from offshore-cultivated seaweed. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 6(4), 387-404, 2012.

LIM, D. K. Y.; GARG, S.; TIMMINS, M; ZHANG, E. S. B.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHUHMANN, H.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Isolation and evaluation of oil producing microalgae from subtropical coastland brackish waters. **PlosOne**, v. 7, n. 7, p. 40751, 2012.

LIN, Q.; LIN, J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. **Bioresource Technology**, 102(2), 1615-1621, 2011.

LIU, Z.-Y.; WANG, G.-C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, 99(11), 4717-4722, 2008.

LINDEN, JS.; HARTMUT. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant Physiology** 125: 810-817, 2001.

LOZANO, D.; ORTIZ, K. Evaluación de la producción de lípidos a partir de la micro alga *scenedesmus* sp certificada y *scenedesmus* sp (nativa) en diferentes condiciones de cultivo para la producción de biodiesel. 56-57. 2019.

LOURENÇO, S. Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações. São Carlos: **Editora RiMa**. 606 p. 2006.

MA, Y.; CHENG, Y.; HUANG, J.; JEAN, J.; HUANG, J.; YU, C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 37(8), 1543-1543. 2014.

MARTIN, FPH. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. **Tesis de Maestría en Ingeniería**. National University of Singapore, 2010.

MARLEIX M. Sur Les Biocarburants. Règlement Commission des Finances, de L'Économie Générale. Article 146. Asamblea Nacional. Rapport 1622 d'information, Asamblea Nacional de Francia, 2004.

MORAIS, M.; COSTA, J.; V. Perfil de Ácidos Graxos de Micro algas Cultivadas com Dióxido de Carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol. 32, n° 4, 1245-1251. 2008.

MONSALVE, J.; DE PÉREZ, V.; COLORADO, Á. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. **Dyna**, 73(150), 21-27, 2006.

MONTHIEU, C. Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel. Universidad pontificia comillas. Escuela técnica superior de ingeniería (ICAI). **Ingeniería en organización industrial**. Madrid. pp.45-46, 2010.

MOLINA, GE.; ACIEN, FG.; FERNANDEZ, J.; CAMACHO, F.; CHISTI, Y, Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. **Journal of Biotechnology** 70: 231– 247, 1999.

MEHLITZ, TH. Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors. **Tesis de Maestría**. California Polytechnic State University, USA, 2009.

NIGAM, P.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, 37(1), 52-68, 2011.

NOAA. National oceanic and atmospheric administration. Retrieved January 23, (2012), from <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/> Narváez, P. C., Sánchez, F. J., Torres, J. A. and Ponce de León, L. F. (2004). Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos: variables asociadas al proceso de transformación. *Ingeniería e Investigación*, 55, 41-50, 2012.

NARVÁEZ, P.; SÁNCHEZ, F.; TORRES, J.; PONCE DE LEÓN, L. Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos: variables asociadas al proceso de transformación. **Ingeniería e**

Investigación, 55, 41-50, 2004.

OLIVEIRA, E. G.; DUARTE, J. H.; MORAES, K.; CREXI, V. T.; PINTO, L. I. A. A. Optimization of *Spirulina platensis* convective drying: evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 8, p. 1572-1578, 2010.

ONO; CUELLO. Selection of optimal species for CO₂ sequestration. In: **Second Annual Conference on Carbon Sequestration**, Alexandria, Virginia, USA, May 5–8, 2003.

ORTIZ, M.; CORTÉS C.; SÁNCHEZ, J.; PADILLA, J.; OTERO, A. (Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. **Orinoquia**, 16(1), 11-20. 2012.

POSSO, F. Energía y ambiente: pasado, presente y futuro. Parte dos: Sistema energético basado en energías alternativas. **Geoenseñanza**, 7(1-2), 54-73, 2002.

PULZ. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology** 57: 287-293, 2001.

RADMANN, E.; COSTA, J. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, 2008, Vol. 31, n° 7, 1609-1612. 2008.

RAZO, C.; ASTETE MILLER, S.; SAUCEDO, A.; LUDEÑA, C. Biocombustibles y su impacto potencial en la estructura agraria, precios y empleo en América Latina. Santiago de Chile: **División de Desarrollo Productivo y Empresarial CEPAL**. 2007.

REN21 (2009). Renewables Global Status Report: 2009 Update. Paris, REN21 Secretariat. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 102(1), 100-112, 2009.

RODRIGUEZ, C.; ANDRADE, J.; LUZ, J. Biodiesel CO₂ emissions: A comparison with the main fuels in the Brazilian market. **Fuel Processing Technology**, 90(2), 204-211, 2009.

SUH, I. S.; LEE, C.-G. Photobioreactor engineering: Design and performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 8(6), 313-321, 2003.

SANDER, K.; MURTHY, G. Life cycle analysis of algae biodiesel. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, 15(7), 704-714, 2010.

SERRANO-RUIZ, J.; LUQUE R. Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías. *Anales de Química*, 107(4): 383–389, 2011.

STEPHANOPOULOS, G.; FISCHER, C.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D. Selection and

optimization of microbial hosts for biofuels production. **Metabolic Engineering**, 10(6): 295– 304, 2008.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A.; HAIK, Y.; FARID, M. Growth of microalgae using CO₂ enriched air for biodiesel production in supercritical CO₂. **Renewable Energy**, v. 82, p. 61-70, 2015.

TIMILSINA, G.; MEVEL, S. Biofuels and Climate Change mitigation: A CGE Analysis Incorporating Land-use change. **Policy Research Working Paper 5672**. World Bank, Washington D.C, 2010.

TSARENKO, P; PETLOVANNY, O. Diversity of algae in Ukraine. *Algologia Suppl.* (Unnumbered). 1-130. 2001.

VAN BEILEN, J. B. Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy**, 4(1), 41-52, 2010.

VAZIRZADEH, M.; ROBATI, R. Investigation of bio-ethanol production from waste potatoes. **Annals of Biological Research**, 4(1), 104-106, 2013.

WEI, C. Y.; HUANG, T. C.; CHEN, H. H. Biodiesel production using supercritical methanol with carbon dioxide and acetic acid. **Journal of Chemistry**, 2013.

WILCOVE, D.; KOH, L. Addressing the threats to biodiversity from oil-palm agriculture. **Biodiversity and Conservation**, 19(4), 999-1007. 2010.

WYNNE, J; HALLAN, J. Reinstatement of *Tetrademus* G.M Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium*. 126, 83-86. 2015.