

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

TAMARA LORRANY DE SOUZA

Avaliação da extração de lipídios da microalga *Chlorella Minutíssima* utilizando o método
Bligh e Dyer adaptado com esferas de vidro

Lorena – SP

2019

TAMARA LORRANY DE SOUZA

Estudo da viabilidade do processo de extração de lipídios da microalga *Chlorella
Minutíssima* pelo método Bligh e Dyer utilizando esferas

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade
de São Paulo, como exigência parcial para
obtenção do título de engenheira química.

Orientador: Prof. Dr. Gerônimo Virginio Tagliaferro

Lorena – SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Tamara Lorrany de
Avaliação da extração de lipídios da microalga
Chlorella Minutíssima utilizando o método Bligh e
Dyer adaptado com esferas de vidro / Tamara Lorrany
de Souza; orientador Gerônimo Virginio Tagliaferro -
Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
40 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Química - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2019

1. Biodiesel. 2. Microalgas. 3. Extração de
lipídios. I. Título. II. Tagliaferro, Gerônimo Virginio
, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar força e conforto perante as dificuldades. A toda minha família pelos desejos de sucesso e em especial aos meus pais Rosane e Itamar por todos ensinamentos, oportunidades e o amor incondicional.

Agradeço ao professor Gerônimo Virginio Tagliaferro pelo aprendizado e orientação nesse trabalho e ao seu aluno de iniciação científica Jefferson Natanael pelo apoio nas etapas iniciais dos procedimentos laboratoriais.

Ao Laboratório de Bioprocesso, Biopolímeros e Simulação da Escola de Engenharia de Lorena pela realização dos experimentos que compuseram essa monografia.

Aos amigos que tornaram toda essa caminhada menos árdua e concederam momentos de descontração e companheirismo.

RESUMO

DE SOUZA, TAMARA LORRANY. Estudo da viabilidade do processo de extração de lipídios da microalga *Chlorella Minutíssima* pelo método Bligh e Dyer utilizando esferas. 2019. 40f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Com a necessidade de substituição dos combustíveis fósseis por alternativas mais sustentáveis surge o dilema de se encontrar fontes que mesclam qualidade e rentabilidade. O setor de biocombustíveis tem se fortalecido devido ao incentivo de políticas públicas que favorecem a produção e com isso manifestam-se conflitos com o uso de oleaginosas ligadas ao mercado alimentício, que apesar de serem uma alternativa para os combustíveis não renováveis, apresentam a desvantagem da competição por áreas cultiváveis e a degradação do solo, provocada principalmente pela atividade de monocultura e a alta adição de fertilizantes. A utilização de microalgas na produção de biodiesel apresenta-se como alternativa favorável, pois além de possuírem elevada taxa de desenvolvimento produtivo e alto teor de óleo em sua composição, não concorrem por terras aráveis e contribuem para a captura de gás carbônico. Tornar a extração desse óleo uma técnica economicamente viável é o grande desafio para o avanço de biocombustíveis de terceira geração. Desse modo, determinar metodologias mais eficientes para aplicação dessa biomassa se faz necessário, assim, o trabalho visa avaliar a extração de lipídio na microalga *Chlorella minutíssima* utilizando o método Bligh e Dyer adaptado com esferas de vidro. Essa técnica foi comparada com a extração por meio da perturbação celular utilizando a energia das ondas sonoras na sonicação. Por meio do percentual de lipídios obtido do experimento pode-se observar um aumento de 36,31% nas amostras com esferas, confirmando que esse método apresenta-se melhor em relação ao rompimento proporcionado pelo ultrassom.

Palavras-chave: Biodiesel. Microalgas. Extração de lipídios.

ABSTRACT

DE SOUZA, TAMARA LORRANY. Feasibility study of the *Chlorella Minutíssima* microalgae lipid extraction process by the Bligh and Dyer method using spheres. 2019. 40f. Monograph (Completion of Course Work in Chemical Engineering) - Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The necessity to replace fossil fuels with more sustainable alternatives comes up with the dilemma of finding sources that mix quality and profitability. The biofuels sector has been strengthened due to the encouragement of the public policies that favor production and because of this, thus, conflicts with the use of oilseeds linked to the food market, which, despite being an alternative to non-renewable fuels, have the disadvantage because of competition for arable land and degradation soil, mainly caused by monoculture activity and high fertilizer addition. The use of microalgae in biodiesel production is a favorable alternative, since besides having a high rate of productive development and high oil content, they do not compete for arable land and contribute to the capture of carbon dioxide. Making the extraction of this oil an economically viable technique is a major challenge to the advancement of third generation biofuels. Thus, determining more efficient methodologies for the application of this biomass is necessary, thus, the work aims to evaluate the lipid extraction in the microalgae *Chlorella minutíssima* using the Bligh and Dyer method adapted with glass beads. This technique was compared with extraction through cell perturbation using sound wave energy in sonication. Through the percentage of lipids obtained from the experiment it was observed an increase of 36.31% in the samples with spheres, confirming that this method is better in relation to the rupture provided by ultrasound.

Keywords: Biodiesel. Microalgae. Lipid extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100) - 2008-2017	11
Figura 2 - Lagoas de alta taxa e fotobiorreatores	15
Figura 3 - Representação de sistema aberto e fechado.....	16
Figura 4 - Métodos de ruptura celular.....	18
Figura 5 - Moinho de esferas de estrutura vertical.....	19
Figura 6 - Moinho de esferas de estrutura horizontal.....	20
Figura 7 - Diagrama de fases clorofórmio, metanol e água	22
Figura 8 - Aparato experimental do cultivo de <i>Chlorella minutissima</i>	24
Figura 9 - Biomassa obtida após processo de cultivo	24
Figura 10 - Esferas de vidro 0,5 μ m de diâmetro	26
Figura 11 – Análise estatística das técnicas de extração de lipídio.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da produtividade de óleo de algumas fontes de biodiesel.....	12
Tabela 2 - Composição celular de lipídios, proteínas e carboidratos	13
Tabela 3 – Relação de massa de cultivo e esferas nas amostras	28
Tabela 4 - Resultados obtidos nos métodos de extração de lipídios	29
Tabela 5 - Diferença estatística entre as técnicas de extração.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos experimentos	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
B10	Percentual de 10% de biodiesel adicionado ao óleo diesel
B11	Percentual de 11% de biodiesel adicionado ao óleo diesel
LED	Light Emitting Diode
MME	Ministério de Minas e Energia
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PROÁLCOOL	Programa Nacional do Álcool
PROÓLEO	Programa de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos
UBRABIO	União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene

SUMÁRIO

1. Introdução	7
1.1. Contextualização.....	7
1.2. Justificativa	8
1.3. Objetivos	9
1.3.1. Objetivo Geral.....	9
1.3.2. Objetivo Específico.....	9
2. Revisão Bibliográfica.....	10
2.1. Perspectivas no cenário nacional	10
2.2. Microalgas.....	12
2.3. Sistemas de cultivo.....	15
2.4. Métodos de extração	17
3. Método	23
3.1. Método de pesquisa.....	23
3.2. Cultivo.....	23
3.3. Extração dos lipídios	25
3.4. Análise dos resultados.....	27
4. Resultados e Discussão	28
5. Conclusões	32
5.1. Sugestões para trabalhos futuros	32
Referências.....	33

1. Introdução

1.1. Contextualização

Quando apresentado em 1900 pelo Dr. Rudolph Diesel na Exposição Universal em Paris, o motor de combustão por compressão era projetado para funcionar com óleos vegetais, como o óleo de amendoim. Com a acessibilidade de custo e produção, os derivados do petróleo se destacaram como fonte energética. Com a crise do petróleo na década de 1970, diversos países se mobilizaram em busca de novas opções para reduzir o uso do hidrocarboneto. Com os preços exorbitantes do barril, foi necessário investir em um combustível alternativo. Em 1980, a Comissão Nacional de Energia instituiu o Programa de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (PROÓLEO) com o intuito de substituir o diesel por óleos vegetais. Porém, como prioridade política o Programa Nacional do Álcool ou PROÁLCOOL obteve maiores investimentos, desenvolvendo assim, a produção em larga escala do etanol (PINHO; SUAREZ, 2017).

Já em 2004, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) foi uma iniciativa do Governo Federal com o objetivo de propiciar a utilização do biodiesel na matriz energética nacional, implementando para isso, qualidade de produção, diversidade de matérias primas e inclusão social da agricultura familiar. A Lei nº 13.263/2016 determina uma adição progressiva de biodiesel ao óleo diesel, sendo que, a proporção se encontra em 11% (B11) desde setembro de 2019. Essa adição tem proporcionado um aumento considerável na produção de biodiesel no país e a tendência é que o acréscimo perpetue até 2023 com um percentual de 15% (ANP, 2019; MME, 2018).

Segundo a União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene (UBRABIO), o avanço do B10 para o B11 impactará em um aumento de produção de 200 milhões de litros, podendo alcançar um consumo anual de biodiesel de 6 bilhões de litros. Esse incremento é uma alternativa para reduzir a importação do diesel e valorizar a economia interna além de reduzir em 7,3% as emissões de gases do efeito estufa (UBRABIO, 2019).

O país possui estrutura para atender essa demanda. A capacidade produtiva sofre uma ociosidade e devido à estagnação no mercado muitas usinas fecharam. Com o incentivo de políticas públicas esse setor poderá se reestruturar, proporcionando geração de renda e relevância no produto nacional (UBRABIO, 2018).

A soja é a matéria-prima predominante na produção do biodiesel, com um equivalente de 71,6% da demanda nacional. Em segundo encontra-se a gordura animal com um total de 16,8% seguida por 11,3% de outros materiais graxos e 0,3% de óleo de algodão (ANP, 2018).

Programas do Governo, Institutos de Pesquisa e Universidades buscam novas fontes energéticas para diversificar o meio de obtenção do óleo. Nesse cenário, a utilização de microalgas ganha destaque e a tendência é se alcançar maiores investimentos para atender a necessidade do mercado numa relação viável de custo e qualidade (COLLARES, 2016; GOH et al., 2019).

1.2. Justificativa

A necessidade de substituição dos combustíveis fósseis por fontes mais sustentáveis elevou as pesquisas e investimentos nesse ramo nos últimos anos. Iniciativas do Governo visando o incremento de biodiesel ao óleo diesel possibilitaram alavancar a produção do biocombustível no mercado brasileiro. Entretanto, cerca de 72% da produção nacional é proveniente da soja e outras leguminosas, que apesar de serem uma alternativa para os combustíveis não renováveis, apresentam a desvantagem da competição por áreas cultiváveis e a degradação do solo, provocada principalmente pela atividade de monocultura e a alta adição de fertilizantes (ANP, 2018; DERMIBAS, 2011; GOH et al., 2019).

Estudos visando a utilização de microalgas na produção de biodiesel tem ganhado atenção. Além de possuírem elevada taxa de desenvolvimento produtivo, não concorrem por terras aráveis, contribuem para a captura de gás carbônico e possuem significativas quantidades de óleo em sua composição (GOH et al., 2019).

A utilização de microalgas na produção de biodiesel requer os estágios de cultivo, colheita, extração de lipídios, transesterificação e purificação do produto. Aprimorar essas etapas de forma que atendam a demanda comercial é o grande empecilho para o avanço de biocombustíveis de terceira geração (ANSARI et al., 2017; LUPATINI, 2016; VIEGAS, 2010).

Desse modo, determinar metodologias mais eficientes de produção de óleos se faz necessário, visto que, a utilização de microalgas em escala industrial ainda requer muitos investimentos para se alcançar aplicabilidade no mercado (ANSARI et al., 2017; BASTOS et al., 2015; CHENG, TIMILSINA, 2010).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo Geral

O intuito do trabalho foi verificar a eficiência de extração de lipídios para a produção de biodiesel pelo método Bligh e Dyer adaptado utilizando esferas de vidro como recurso para se obter um rompimento mais eficiente da parede celular das microalgas.

1.3.2. Objetivo Específico

- Realizar extração de lipídios com o método Bligh e Dyer adaptado e comparar a ação mecânica proporcionada pela técnica de ultrassom com a utilização de esferas de vidros;
- Testar e comparar procedimentos de extração de óleo com e sem o uso das esferas;
- Analisar a eficiência da utilização de esferas de vidro.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Perspectivas no cenário nacional

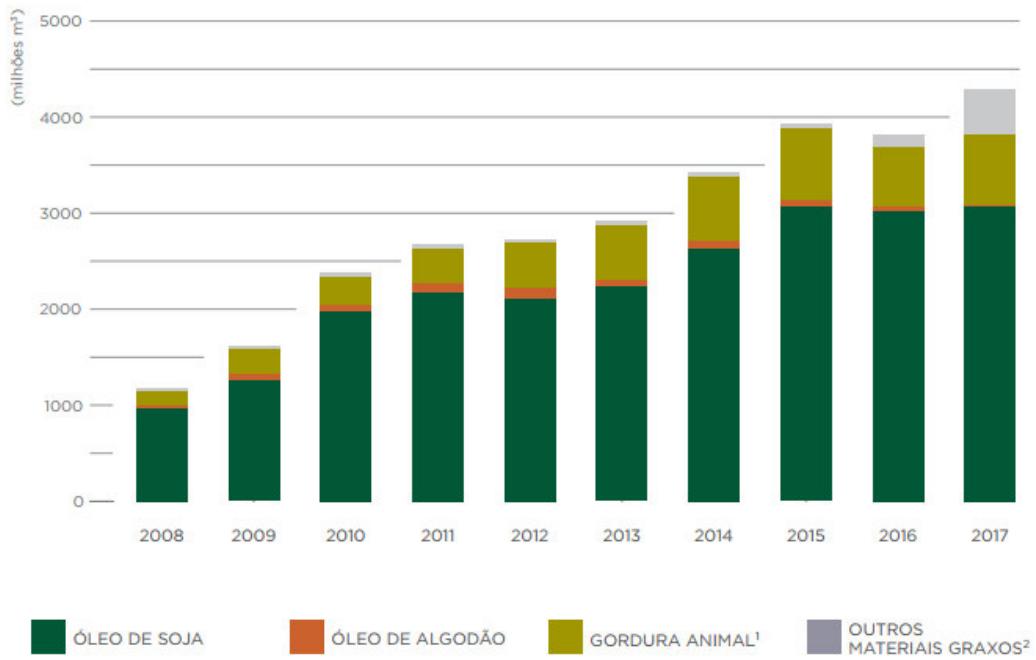
Segundo a definição da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), biodiesel é um combustível renovável obtido a partir do processo de transesterificação, onde os triglicerídeos presentes nos óleos e gordura animal reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, resultando no biodiesel e glicerina como produtos.

Em 2018, a produção nacional de biodiesel correspondeu a 56,2% da capacidade efetiva. Isso demonstra ociosidade em atender a requisição do mercado que tende a aumentar com o incentivo de políticas públicas para maiores percentuais de biodiesel ao diesel. A expectativa do Governo é que a produção aumente em 85% em 2023, atingindo um volume de 10 bilhões de litros (ANP, 2018; VEDANA, 2018).

Neste contexto, comprovada a viabilidade técnica do percentual de mistura, surge o desafio de buscar matérias-primas que unam qualidade, eficiência e sustentabilidade. Apesar de gerarem menores impactos quando comparadas aos combustíveis provenientes de hidrocarbonetos, o uso das oleaginosas convencionais na fabricação do biodiesel interferem no setor de alimentos e trazem todas as consequências da agricultura. Para atender a carência de suprimentos e evitar crises em outros setores é necessário optar por fontes que afetem minimamente e forneçam padrão elevado e praticabilidade econômica (ANSARI et al., 2017; DERMIBAS, 2011).

O cenário atual demonstra um crescimento de materiais graxos alternativos à soja, conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100) - 2008-2017



Fonte: ANP, 2018.

Apesar de lento, esse avanço evidencia a investida por novas opções que atendam às exigências internacionais do biodiesel. A viabilidade da matéria-prima considera fatores como a quantidade de óleo para extração e a complexidade desse processo, a produtividade por unidade de área, o equilíbrio agronômico, o ciclo de vida da planta e o impacto socioambiental gerado (RAMOS et al., 2017).

Considerando aspectos de teor de óleo, a soja não retém capacidades consideráveis e sua utilização como base da produção do biodiesel no Brasil se caracteriza pelo alto número de plantações da cultura. Visto isso, cultivos capazes de armazenar maiores quantidades de óleo são mais interessantes para complementar a demanda de materiais graxos, como alternativa de manter alto padrão na geração do biocombustível (RAMOS et al., 2017).

A Tabela 1 indica a produtividade de algumas oleaginosas, assim como o percentual de óleo, rendimento e a área necessária para o cultivo.

Tabela 1 - Comparação da produtividade de óleo de algumas fontes de biodiesel

Oleagionosas	Óleo (%)	Rend. de óleo (L/ha)	Área necessária (m ² ano/kg biodiesel)	Produtividade de biodiesel (kg biodiesel/ha ano)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Canola	41	974	12	862
Girassol	40	1307	11	946
Palma	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58.7	0.2	51.927
Microalga (alto teor de óleo)	70	136.9	0.1	121.104

Fonte: Adaptado (VIEGAS, 2010).

O alto teor de óleo encontrado nas microalgas, cerca de 70% do seu peso seco, e a pouca área necessária para o cultivo são os principais fatores que tornam esses organismos atraentes para atuar, futuramente, em peso na indústria de combustíveis (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Segundo Dermibas (2011) o biodiesel proveniente do óleo de microalgas é uma alternativa promissora para se reduzir os problemas de poluição.

2.2. Microalgas

As microalgas são microrganismos unicelulares fotossintetizantes, podendo variar de 5 a 50 micrômetros (5-50 µm). Esses seres são categorizados em algas verdes, algas vermelhas e diatomáceas que seguem critérios de acordo com sua estrutura celular e pigmentação. Estudos contemporâneos não são capazes de afirmar o número exato de espécies existentes mas estabelecem mais de 200 mil representantes do grupo (CHAVES, 2016; DERNER et al., 2006).

São utilizadas nos setores de alimentos, fármacos e combustíveis por sua capacidade de produzir proteínas, carboidratos e lipídios em um período relativamente curto e com baixas exigências nutricionais, e também por contribuírem para a biofixação de resíduos de CO₂ (BRENNAN; OWENDE, 2010; DERMIBAS, 2011; TORRES, 2014).

A Tabela 2 apresenta o percentual de composição orgânica de algumas espécies de microalgas.

Tabela 2 - Composição celular de lipídios, proteínas e carboidratos

Espécies	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)
<i>Anabaena cylindrica</i>	4-7	43-56	25-30
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	-	-
<i>Chlorella minutissima</i>	31	-	-
<i>Chlorella protothecoides</i>	55	10-52	10-15
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-22	51-58	12-17
<i>Dunaliella salina</i>	6	57	32
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	28	-	-
<i>Ettlia oleoabundans</i>	35-54	-	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25	-	-
<i>Isochrysis galbana Parke</i>	25	30-45	7-25
<i>Monoraphidium minutum</i>	52	-	-
<i>navicula saprophila</i>	51	-	-
<i>Nitzschia closterium</i>	27	-	-
<i>Prymnesium parvum</i>	22-38	28-45	25-33
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40	8-18	21-52
<i>Scenedesmus obliquus</i>	35-55	50-56	10-17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9	47	-
<i>Spirogyra sp.</i>	11-21	6-20	33-64
<i>Tetraselmis maculata</i>	3	52	15
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23	-	-

Fonte: Adaptado (SHUBA, KIFLE, 2018).

Esses microrganismos podem absorver carbono tanto na forma orgânica quanto na inorgânica. Quando o meio fornece essas duas possibilidades de fonte de carbono, o metabolismo é chamado de mixotrófico. Ademais, as microalgas podem ser autotróficas, quando utilizam somente nutrientes inorgânicos, ou heterotróficas, quando fazem uso de substâncias orgânicas. O sistema fotoautotrófico é o mais utilizado para produções em larga escala principalmente pelo menor custo de produção quando comparado as outras condições e também pela assimilação de CO₂. Espécies como a *Chlorella vulgaris* e *Chlorella*

minutíssima adaptam-se as três formas de metabolismo (BRENNAN; OWENDE, 2010; GRIS et al., 2010; VIEGAS, 2010; HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

Microalgas assimilam os nutrientes de águas residuais ao qual estão contidos ou de uma mistura diluída de lixiviado. Esse último meio é uma alternativa sustentável e aplicável para o cultivo já que apresenta todas as condições necessárias para o crescimento microalgal além de reaproveitar o chorume que é um resíduo altamente poluente e de difícil tratamento (GOH et al., 2019).

Os meios de cultivo podem ser classificados como descontínuos, contínuos e semicontínuos. Nos descontínuos a cultura recebe nutrientes apenas no início do processo sendo possível observar as seis fases de crescimento: Fase de adaptação ou fase lag, Fase de aceleração do crescimento, Fase de crescimento exponencial, Fase de desaceleração do crescimento, Fase estacionária e Fase de morte (LOURENÇO, 2006).

No cultivo contínuo, um meio de cultura novo é introduzido no sistema em taxas constantes e no semicontínuo apenas uma parcela é renovada durante a Fase exponencial (LOURENÇO, 2006).

Para garantir o crescimento microalgal o meio deve dispor da presença de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas. Os macronutrientes garantem a formação da estrutura de biomoléculas, membranas e meio intracelular e regulam as atividades metabólicas, sendo os principais carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício e ferro. Como micronutrientes se destacam o manganês, molibdênio, cobalto, boro, vanádio, zinco, cobre e selênio e são fundamentais para estrutura e atividades enzimáticas. As vitaminas devem se apresentar em baixas concentrações para a espécie *Chlorella minutíssima*, as mais usuais são a tiamina (B1), biotina (B7) e cianocobalamina (B12) e atuam como coenzima e no transporte de CO₂ (LAIATE, 2018; LOURENÇO, 2006).

A microalga *Chlorella minutíssima* apresenta grande capacidade fotossintética, alta taxa de clorofila, boa produtividade nos diferentes sistemas de cultivo, além de possuir elevado teor de óleo, conforme observado na Tabela 2.

Após extraídos, esses lipídios podem ser transesterificados e convertidos em biodiesel (DERMIBAS, 2011; VIEGAS, 2010).

2.3. Sistemas de cultivo

Os principais métodos de produção se classificam em sistemas abertos, onde as culturas se desenvolvem em tanques em contato com o ar atmosférico chamadas de lagoas de alta taxa (*raceways*), e sistemas fechados, que empregam os fotobiorreatores (DERNER, 2017). A Figura 2 apresenta esses sistemas de cultivo.

Figura 2 - Lagoas de alta taxa e fotobiorreatores



Fonte: AGROENERGIA EM REVISTA, 2016.

Os tanques abertos possuem um custo operacional menor, no entanto, esse método está sujeito a contaminações e variações climáticas além de resultar em baixa produtividade se não tiverem um mecanismo de agitação eficiente. Uma estratégia para se evitar a contaminação com outros organismos é se trabalhar com um sistema semicontínuo, porém não é totalmente assegurado de contaminações. Já os fotobiorreatores, além de necessitar de menor área de instalação, possibilitam atingir elevados volumes de produção em razão da disponibilidade de controle de parâmetros de cultivo como luz, temperatura, concentração

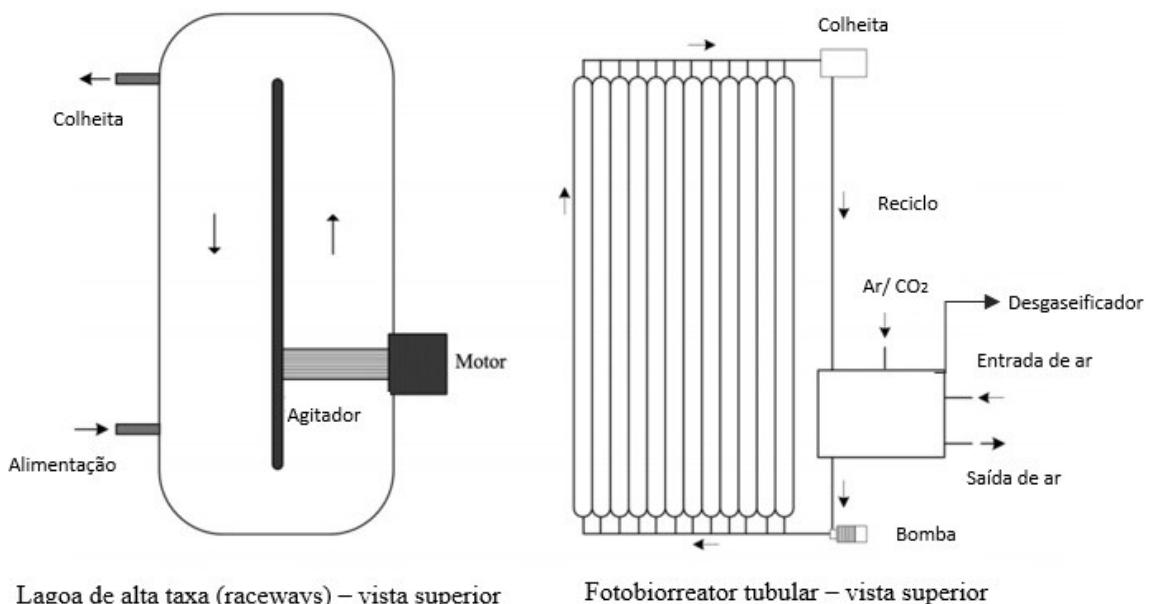
de nutrientes, salinidade, pH e densidade celular (AGROENERGIA EM REVISTA, 2016; DERNER, 2017; GOH et al., 2019; SUALI; SARBATLY, 2012).

Os sistemas de agitação nas lagoas abertas podem variar dependendo do mecanismo mecânico de mistura. Quanto a construção, são utilizados materiais como argila, tijolo e cimento ou materiais mais nobres como o policloreto de vinila, fibra de vidro ou poliuretano (AGROENERGIA EM REVISTA, 2016).

O princípio de funcionamento dos fotobiorreatores é aumentar a incidência de luz para cada célula. Para isso, o *design* é fundamental para se atingir melhores resultados. Esses sistemas são fabricados com materiais com propriedades de transparência que permitem a passagem de luz como vidro, plástico e policarbonato e apresentam estruturas e meios de agitação diversificados, sendo que os mais usuais são os tubulares, variantes verticais (bags), placas planas, helicoidais, *airlift* e colunas de bolhas (DERNER, 2017).

A Figura 3 apresenta um esquema do sistema aberto e fechado.

Figura 3 - Representação de sistema aberto e fechado



Fonte: Adaptado (SUALI; SARBATLY, 2012)

Outro fator influente nos fotobiorreatores envolve a baixa transferência de massa gás-líquido na mistura, fator que ocorre devido ao aumento da concentração de oxigênio a medida que a atividade fotossintética avança. Isso contribui para remoção de gás carbônico

e inibe o crescimento das microalgas (AGROENERGIA EM REVISTA, 2016; SUALI; SARBATLY, 2012).

O *airlift* apresenta produtividade satisfatória para o cultivo de microalgas. Seu sistema permite a circulação de fluidos por meio de uma agitação pneumática e favorece a troca de material no sistema (GRIS et al., 2010; TAGLIAFERRO et al., 2019).

Para a iluminação são utilizadas lâmpadas fluorescentes permitindo uma produção contínua porém com alto consumo de energia (BRENNAN; OWENDE, 2010).

De acordo com o estudo de JENA et al. (2011) a microalga *Chlorella minutissima* alcançou melhores resultados de crescimento com o uso de lâmpadas LED (Light Emitting Diode) na cor branca com intensidade de $80 - 110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.4. Métodos de extração

Caracterizados como substâncias orgânicas insolúveis em água e solúveis em solventes não polares, os lipídios são grupamentos de substâncias que são classificadas como lipídios simples ou complexos (RODWELL et al., 2017).

Os lipídios simples incluem ésteres de ácidos graxos como gorduras e ceras. Já os complexos são divididos em fosfolipídios, glicolipídios e outros lipídios complexos incluindo sulfolipídios e aminolipídios. Outras classes englobam o glicerol, esteroides e aldeídos graxos e os lipídios neutros como colesterol (RODWELL et al., 2017).

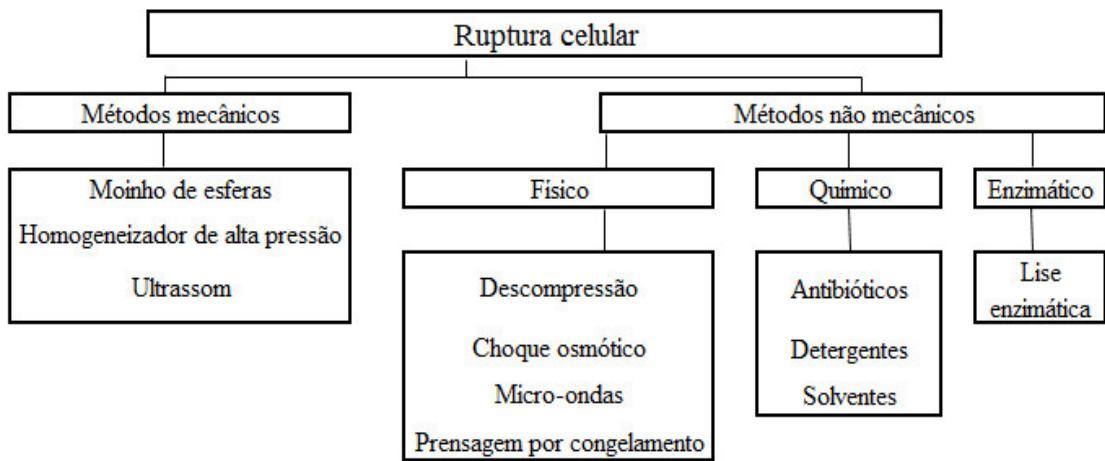
Óleos e gorduras naturais de origem animal e vegetal são denominados triacilgliceróis que são provenientes da reação de esterificação entre uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos (VIEGAS, 2010).

Para se obter o óleo das microalgas é necessário romper a estrutura da parede celular já que a difusão por meio dela é um processo lento e inviável (LEE et al., 2012; VIEGAS, 2010).

A parede é composta em sua maioria de três camadas contendo celulose, ácido urônico, proteína, manose, xilano, glicoproteínas e minerais. Usualmente processos mecânicos de prensagem, equipamentos como ultrassom e micro-ondas ou extração por solventes são os mais utilizados. Quanto mais eficiente for o processo de rompimento da membrana celular melhor será a extração dos lipídios (GOH, et al. 2019; LEE et al., 2012; VIEGAS, 2010).

A Figura 4 apresenta os principais métodos de rompimento da parede celular.

Figura 4 - Métodos de ruptura celular



Fonte: Adaptado (LEE et al., 2012).

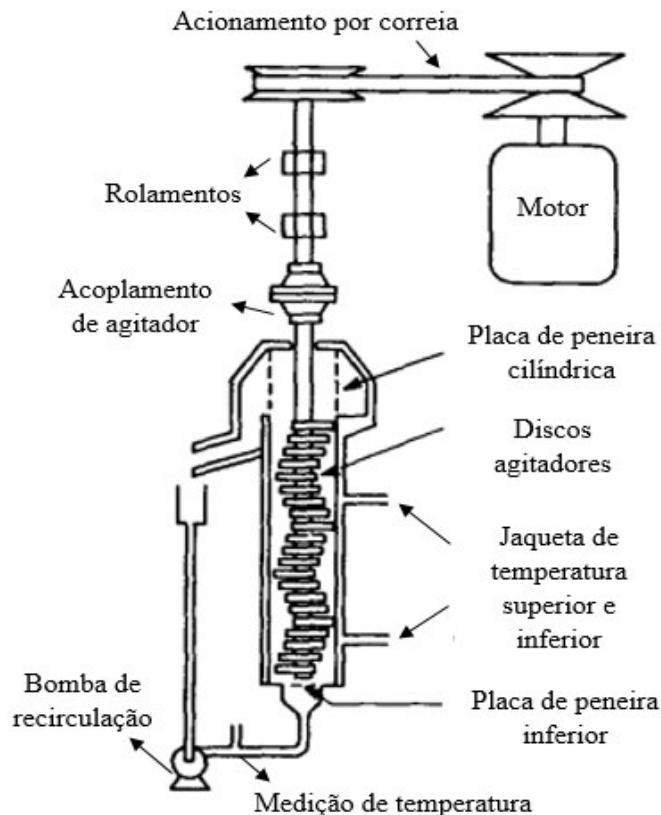
Para suprir a necessidade do mercado de combustíveis é necessário um processo que associe otimização de produto e tempo. Métodos mecânicos exigem altos gastos de energia e equipamentos que encarecem no produto final, no entanto, são os mais viáveis para aplicação industrial (LEE et al.; 2012).

Portanto, usualmente, os lipídios são extraídos da biomassa seca por meio de técnicas de caráter físico somados à adição de solventes, sendo que os mais utilizados são hexano e metanol (SUALI; SARBATLY, 2012).

CHISTI et al. (1986) relatam que os métodos de cisalhamento sólido como o moinho de esferas e cisalhamento líquido como o homogeneizador de alta pressão apresentam bons resultados em larga escala. O estudo descreve o moinho de esferas de vidros como uma câmara cilíndrica com um eixo central movimentado por um motor. A câmara pode ser posicionada verticalmente ou na horizontal sendo que esta última configuração apresenta melhor eficiência de ruptura. As esferas são introduzidas na câmara juntamente com a cultura e por meio de agitação e colisão executam uma ação de trituração sobre as células.

A Figura 5 apresenta a estrutura de um moinho de esferas na posição vertical.

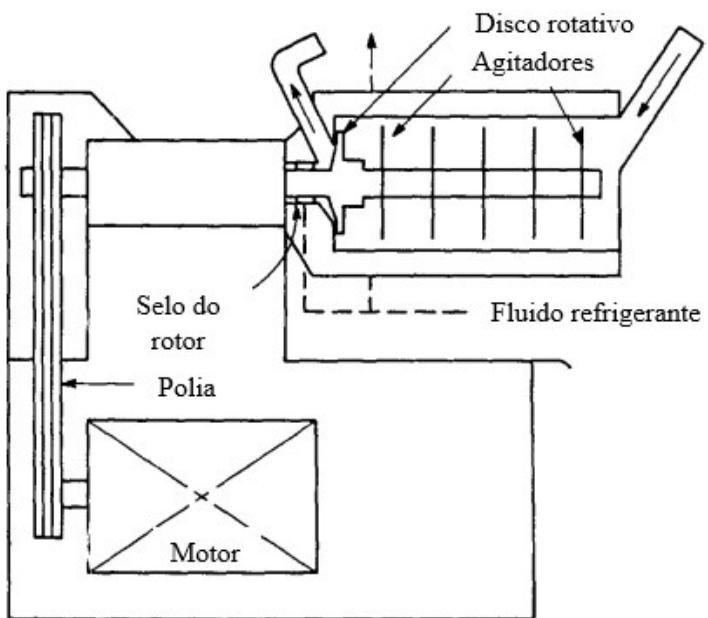
Figura 5 - Moinho de esferas de estrutura vertical



Fonte: Adaptado (CHISTI et al., 1986).

Nessa configuração a carga das esferas de retificação é retida na câmara por um peneira que cobre a entrada inferior em máquinas verticais. Já o sistema na posição horizontal, a entrada e a saída de alimentação estão acima do nível do tanque e o disco rotativo é utilizado como meio de retenção das esferas. A Figura 6 apresenta o esquema dessa estrutura.

Figura 6 - Moinho de esferas de estrutura horizontal



Fonte: Adaptado (CHISTI et al., 1986).

Esse processo é influenciado pelo tamanho e composição das esferas, *design* do agitador, tempo de permanência e variáveis da cultura como temperatura, viscosidade e concentração (CHISTI et al.;1986).

Em se tratando de homogeneizadores de alta pressão, esses equipamentos atuam com pressões de aproximadamente 150 MPa e consistem em bombas de deslocamento que por meio de uma válvula rompe a parede celular. Para LEE et al. (2012) parâmetros de temperatura, vazão e projeto de válvula são as principais influências na eficiência.

LEE et al. (2012) apresentam também outros métodos de perturbação celular como a sonicação em que a energia das ondas sonoras é utilizada com frequência de aproximadamente 25 kHz. Por meio da pressão acústica ocorre a formação de microbolhas e o consequente colapso que gera ondas de choque. Esse fenômeno conhecido como cavitação concentra a energia do ultrassom e criam choques precisos que podem alterar a estrutura de microrganismos. NATARAJAN et al. (2014) concluíram que a extração lipídica ultrassônica em microalgas de paredes rígidas como a *Chorella sp.* é um método eficiente, porém, não é indicado para espécies com paredes flexíveis pois os lipídios podem ficar retidos na membrana.

Fatores como temperatura do meio, tempo de reação e viscosidade podem influenciar na eficiência do processo. Temperaturas muito elevadas diminuem a velocidade de colapso

das bolhas e afetam de forma desfavorável no cisalhamento. Em relação ao tempo é necessário balancear, quanto maior o tempo maior o rompimento celular, porém muitos fragmentos celulares podem afetar na pressão das ondas sonoras. Já menores valores de viscosidade celular permitem maiores choques e disruptão. LEE et al. (2012) relatam que o banho de ultrassom pode ser adaptado com a adição de partículas esféricas de 0,5 mm a 1 mm como forma de atingir maior eficiência, facilitando na ação de esmagamento da amostra.

KIM et al. (2013) mencionam a técnica de choque osmótico. Em seu estudo relatam que as células são rompidas devido ao aumento da pressão. As altas concentrações de sal no meio líquido induz a um estresse hiper osmótico que degrada a parede celular.

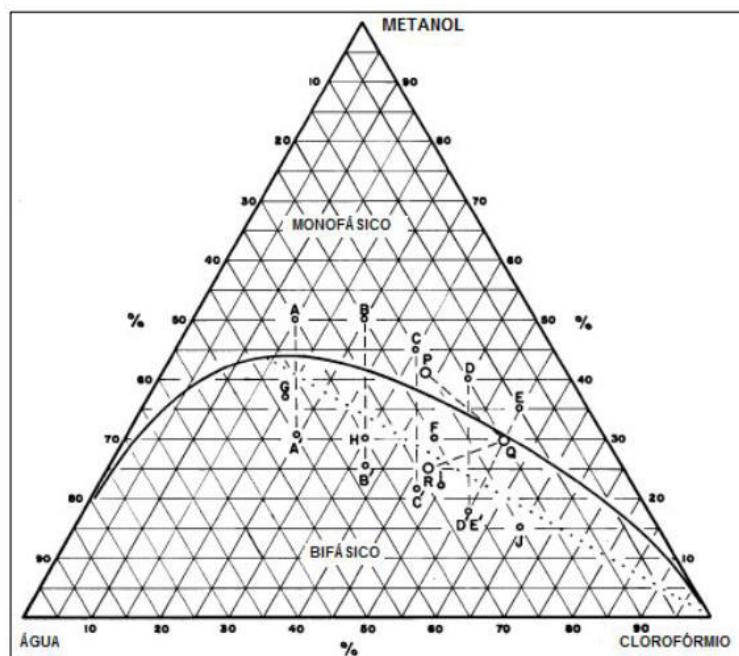
O uso de micro-ondas também se mostra adequado para o rompimento das células e aumenta o rendimento lipídico. O calor gerado por forças de atrito dos movimentos moleculares é rápido e uniforme e permite que o vapor de água rompa as células por dentro permitindo a extração de produtos intracelulares (KIM et al., 2012; LEE et al., 2012).

Outro método apresentado por LEE et al. (2012) é a prensagem por congelamento ou liofilização que é um processo de desidratação utilizado no setor alimentício para conservação. O processo consiste em submeter as amostras congeladas a uma sublimação por meio da aplicação de uma pressão de cerca de 1KPa e temperatura aproximada de 40°C. O alto consumo de energia e tempo são desvantagens da técnica.

Os meios de caráter químico apresentam como vantagem o menor consumo de energia já que não necessitam de grande quantidade de calor e eletricidade, porém existe a possibilidade de contaminação no processo de extração com o uso de produtos químicos como detergentes para aumentar a permeabilidade da estrutura celular. Do mesmo modo, a utilização de ácidos ou bases podem causar reações desfavoráveis, também não sendo indicados para obtenção do biocombustível. A utilização de solventes como acetona ou clorofórmio são eficazes para o rompimento da parede de células bacterianas, já para microalgas esse método não é eficaz (KIM et al., 2012; LEE et al., 2012).

Bligh e Dyer (1959) propuseram o método utilizando clorofórmio e metanol que se mostrou eficaz na extração e purificação de lipídios. A técnica permanece acessível devido a simplicidade e ao menor consumo de tempo podendo ser aplicada tanto em escala comercial quanto laboratorial. Ao se adicionar a mistura de miscível e em seguida acrescentar clorofórmio e água, cria-se duas camadas onde os lipídios podem ser separados. Os autores estudaram a proporção de reagentes que melhor atingiria uma extração quantitativa com base no diagrama da Figura 7.

Figura 7 - Diagrama de fases clorofórmio, metanol e água



Fonte: (BLIGH; DYER, 1959).

Por meio de suas pesquisas, Bligh e Dyer concluíram que mais lipídios foram extraídos da fase monofásica do que pela área bifásica. Utilizando uma amostra de 100g e uma proporção de 100 ml de clorofórmio, 200 ml de metanol e 80 ml de água o resultado obtido na separação das fases foi satisfatória com 0,70 g de lipídio na camada de clorofórmio.

KIM et al. (2013) também apresentaram a utilização de enzimas como um método promissor de rompimento de células. As enzimas mais usadas nessas técnicas são a celulase, neutrase e pectinase e ao contrário dos compostos químicos, elas não provocam interferências na estrutura de ácidos graxos. No entanto, esse método necessita de altos investimentos e no momento se apresenta economicamente inviável.

3. Método

3.1. Método de pesquisa

Esse trabalho classifica-se como sendo de natureza aplicada com o intuito de gerar conhecimento para propósitos práticos. A pesquisa possui caráter experimental e se baseia no estudo, análise e interpretação dos fatos com uma abordagem quantitativa.

A etapa experimental foi conduzida no Laboratório de Bioprocesso, Biopolímeros e Simulação da Escola de Engenharia de Lorena, situado na cidade de Lorena, São Paulo.

3.2. Cultivo

A etapa inicial do projeto consistiu em realizar o cultivo para se obter a biomassa e posteriormente desenvolver o processo de extração de óleo utilizando esferas.

Essa fase empregou-se fotobiorreatores do tipo bolhas de 3,8 L de volume útil, com uso de lâmpadas fluorescentes para iluminação com fluxo de fótons de 125 a 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a temperatura ambiente.

O inóculo utilizado foi obtido por meio de 100 ml de uma cultura reserva da microalga *Chlorella minutissima*, 20 g de cloreto de sódio (sal de cozinha) e 1 ml de soluções de nitrato, fosfato e metais, e 3 gotas de uma solução contendo as vitaminas B1 e B12. Após aproximadamente sete dias sob aeração, o inóculo estava pronto para utilização.

Para o cultivo, uma proporção de 20 g/L de cloreto de sódio foi medido com o auxílio de uma balança analítica. A relação dos demais componentes foi de 5% em volume de chorume e 10% do inóculo, aferidos com uma proveta. Completou-se o volume restante do reator com água destilada e efetuou-se o fechamento do mesmo adicionando-o a bomba para aeração. Essa etapa pode ser observada na Figura 8.

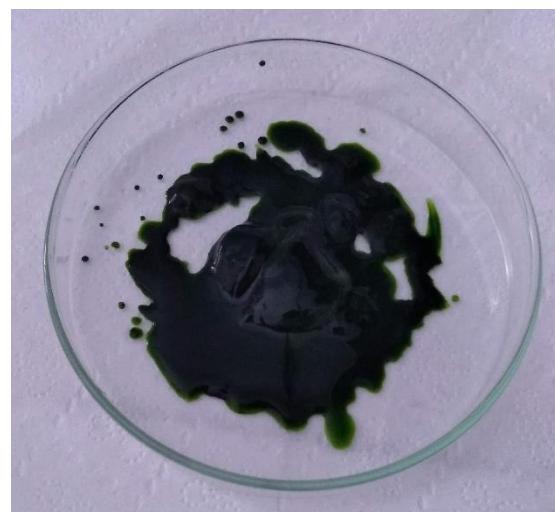
Figura 8 - Aparato experimental do cultivo de *Chlorella minutissima*



Fonte: Da autora.

O cultivo seguiu um ciclo de 10 dias, passando em seguida por uma centrifugação a 2,5 rotações por minuto, durante 10 minutos, que resultou na biomassa como precipitado. Desprezou-se o sobrenadante e o produto foi transferido para uma placa de Petri, conforme representado na Figura 9.

Figura 9 - Biomassa obtida após processo de cultivo



Fonte: Da autora.

A amostra seguiu para a estufa por 24 horas numa temperatura de 60°C.

Após completada a secagem a biomassa foi macerada em um almofariz e reservada em um falcon sob refrigeração.

O procedimento se sucedeu até atingir a quantidade mássica necessária para iniciar a etapa de rompimento celular para a retirada dos óleos. A pouca massa obtida por ciclo exigiu a realização do cultivo sucessivas vezes.

3.3. Extração dos lipídios

A fase de extração de lipídios seguiu a técnica de Bligh e Dyer (1959) onde a biomassa foi submetida a uma mistura de clorofórmio/metanol.

De início calculou-se o percentual de umidade da microalga, adicionando-a em uma balança determinadora de umidade por 30 minutos. Esse índice deve ser determinado para estabelecer a precisão da massa utilizada no experimento.

As etapas seguintes se dividiram na preparação das amostras para a execução das técnicas de extração conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos experimentos

Experimentos	Descrição	Amostras
A	Método com esferas	1
		2
	5 minutos	3
B	Método com esferas	4
		5
	10 minutos	6
C	Método de ultrassom	7
		8
		9

Fonte: Da autora.

As amostras foram dispostas em tubos de falcon de polipropileno onde cada tubo foi demarcado com uma numeração. Os tubos 1, 2 e 3 foram designados para o experimento A, referente ao Método com esferas durante 5 minutos. Os tubos 4, 5 e 6 foram atribuídos para o experimento B, referente ao Método com esferas durante 10 minutos. E os tubos 7, 8 e 9 foram confiados para o experimento C, referente ao Método de ultrassom. Cada amostra

recebeu a adição de 0,2g de biomassa, 1ml de clorofórmio e 1ml de metanol (proporção de 1:1). Acrescentou-se esferas de vidro de 0,5 μm de diâmetro nas amostras referentes aos experimentos A e B, nos tubos do experimento C não se adicionou esferas por se tratar da metodologia com ultrassom.

Figura 10 - Esferas de vidro 0,5 μm de diâmetro



Fonte: Da autora.

As amostras contendo as esferas foram para agitação no vortex, sendo que os tubos 1,2 e 3 foram condicionados à agitação por um período de 5 minutos e os tubos 4, 5 e 6 durante 10 minutos.

Após esse processo, as amostras seguiram para 10 minutos na centrífuga e o sobrenadante foi transferido para recipientes previamente pesados. O procedimento foi realizado em triplicada e após o término as amostras foram dispostas na estufa à 60°C por 24 horas para a evaporação dos solventes.

Os tubos 7, 8 e 9 receberam um banho de ultrassom por 30 minutos e passaram pela centrifugação durante 10 minutos. O processo foi realizado em triplicada e o sobrenadante foi transferido para os recipientes e encaminhados para a estufa.

Após o período de secagem, os recipientes foram pesados e os valores obtidos foram utilizados para o cálculo na determinação de porcentagem de lipídios extraídos.

Para os cálculos determinou-se a massa real de biomassa utilizada em cada amostra por meio subtração da massa de microalga pelo fator de umidade, conforme a equação 1.

$$M_{\text{real}} = M_{\text{microalga}} - f_{\text{umidade}} \quad (1)$$

Para o cálculo da massa de lipídio foi utilizado os valores de massa dos recipientes antes e após o experimento conforme representado na equação 2.

$$M_{lipídio} = M_{final} - M_{inicial} \quad (2)$$

Na determinação do percentual de lipídio extraído utilizou-se a equação 3.

$$\%_{lipídio} = \frac{M_{lipídio} \times 100}{M_{real}} \quad (3)$$

3.4. Análise dos resultados

Para melhor interpretação dos dados, foi utilizado o software STATISTICA 13.0 que possibilita a análise de variância ou ANOVA seguido do Teste Tukey. Por meio da ANOVA pode se determinar a existência ou não de diferença estatística entre as médias dos métodos e o Teste Tukey mostrou com exatidão qual técnica diferiu das demais. Considerou-se como variável resposta cada metodologia aplicada e o teor de lipídio.

4. Resultados e Discussão

A etapa de cultivo foi a que exigiu maior disponibilidade de tempo devido à pouca quantidade de biomassa resultante do processo. No total foram necessários 8 cultivos de 10 dias de ciclo para atingir 3,7458 gramas.

O fator de umidade registrado na balança foi de 8,34%.

A adição de microalga em cada amostra destinadas as técnicas com utilização de pérolas de vidro pode ser observada na Tabela 3, juntamente com a quantidade de esferas dispostas nos tubos.

Tabela 3 – Relação de massa de cultivo e esferas nas amostras

Método	Amostra	Massa de microalga (g)	Massa de esferas (g)
A	1	0,2006	1,4336
A	2	0,2007	1,6723
A	3	0,2012	1,6730
B	4	0,2009	1,5134
B	5	0,2013	1,8950
B	6	0,2005	1,9097
C	7	0,2017	-
C	8	0,2014	-
C	9	0,2013	-

A – Método com esferas durante 5 minutos; B – Método com esferas durante 10 minutos; C – Método de ultrassom.

Fonte: Da autora.

Com os resultados obtidos das equações 1, 2 e 3, pode-se construir a Tabela 4.

$$M_{real} = M_{microalga} - f_{umidade} \quad (1)$$

$$M_{lipídio} = M_{final} - M_{inicial} \quad (2)$$

$$\%_{lipídio} = \frac{M_{lipídio} \times 100}{M_{real}} \quad (3)$$

Tabela 4 - Resultados obtidos nos métodos de extração de lipídios

Método	Amostra	M real (g)	M inicial (g)	M final (g)	M lipídeos (g)	% lipídeos
A	1	0,1839	8,7269	8,7857	0,0588	32,0
A	2	0,1840	8,7045	8,7615	0,0570	31,0
A	3	0,1844	8,7201	8,7783	0,0582	31,6
B	4	0,1841	8,4040	8,4718	0,0678	36,8
B	5	0,1845	8,4609	8,5254	0,0645	35,0
B	6	0,1838	8,7236	8,7793	0,0557	30,3
C	7	0,1849	8,4523	8,4958	0,0435	23,5
C	8	0,1846	8,9081	8,9499	0,0418	22,6
C	9	0,1845	8,6642	8,7071	0,0429	23,3

A – Método com esferas durante 5 minutos; B – Método com esferas durante 10 minutos; C – Método de ultrassom.

Fonte: Da autora.

As informações coletadas permitiram comparar o rendimento das técnicas. Tanto a utilização das esferas quanto o ultrassom utilizam o conceito de ruptura por meio mecânico e provocam alterações na estrutura da microalga que possibilitam uma obtenção eficiente do óleo. No entanto, cada método apresenta sua particularidade.

A análise da ANOVA constatou que existe diferenças entre as médias de pelo menos uma das técnicas e, por meio do Teste Tukey gerou-se a Tabela 5.

Tabela 5 - Diferença estatística entre as técnicas de extração

Método	Variância 1	Variância 2 *	
Método de ultrassom	C	23,13 ^b	****
Método com esferas 5 minutos	A	31,53 ^a	****
Método com esferas 10 minutos	B	34,03 ^a	****

*Índices análogos representam dados estatisticamente iguais.

Fonte: Da autora.

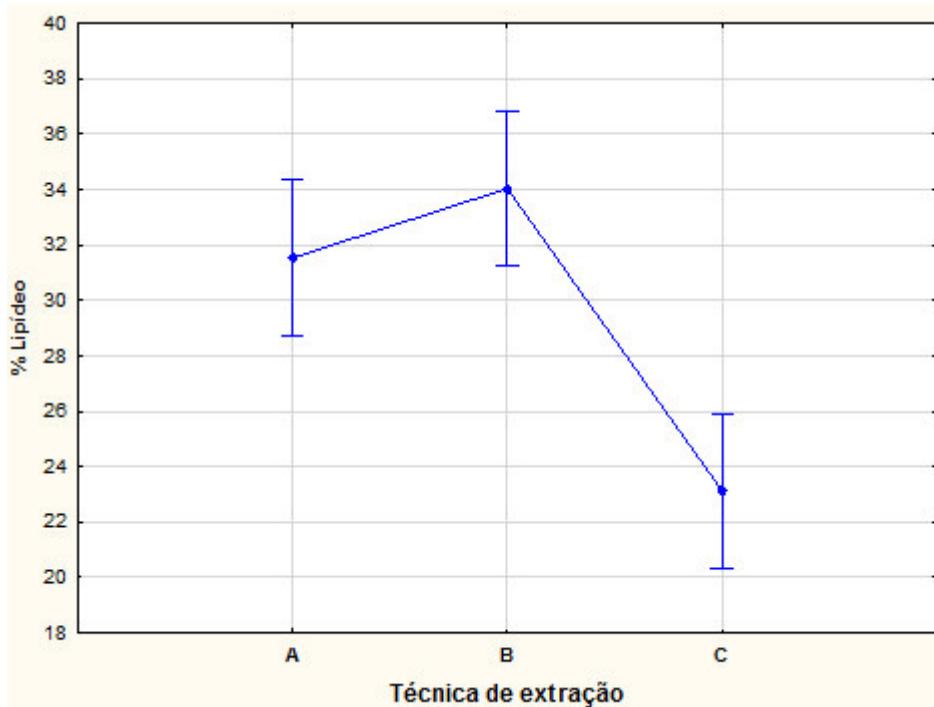
Ao comparar o valor de lipídio extraído pelo método tradicional (C = 23,13%) em relação ao novo método proposto com as esferas no tempo de 5 minutos (A = 31,53%) o aumento foi de 36,31%. Já comparando o método proposto, porém, com tempos de agitação

diferentes ($A = 5$ min e $B = 10$ min), pode-se verificar que o método com menor tempo, amostra A, apresentou-se melhor, pois estatisticamente os valores de extração são iguais.

O Teste Tukey com 95% de confiança possibilitou concluir que as técnicas A e B são estatisticamente iguais e a C se diferencia das demais.

O gráfico da Figura 11 representa visualmente esse resultado.

Figura 11 – Análise estatística das técnicas de extração de lipídio



Fonte: Da autora

Pelo Teste de Tukey ficou visível que o método de extração utilizando as esferas de vidro apresentou dados estatísticos análogos e atingiu um potencial maior quando comparadas as amostras que receberam o banho de ultrassom.

As amostras expostas à agitação de 10 minutos resultaram num maior percentual de lipídio. A tensão proveniente da movimentação das esferas combinado a um período mais extenso proporcionaram melhores resultados.

O banho de ultrassom além de exigir uma durabilidade maior, totalizando 90 minutos de exposição para a tréplica, também requer gastos de energia para o funcionamento do equipamento.

As esferas de vidro para uso laboratorial também apresentam desvantagens em relação a aquisição no mercado. No entanto, pode-se verificar que uma pequena quantidade foi suficiente para adquirir um resultado satisfatório. Com o investimento nessa técnica a obtenção futura pode se tornar mais acessível.

Considerando todos os fatores de rendimento, tempo e custo a utilização de esferas apresentou-se melhor em relação ao rompimento proporcionado pelas ondas sonoras.

Analizando outras referências, pode-se constatar conclusões distintas. Lee et al. (2010) realizaram experimentos de extração lipídica para 0,5g de biomassa seca para a espécie *Chlorella vulgaris* com uma mistura de clorofórmio e metanol (1:1). Em seus estudos, compararam as técnicas utilizando autoclave a 125 °C com 1,5 MPa, colisão de esferas de diâmetro de 0,1 mm por 5 minutos, micro-ondas a 100 °C e 2450 MHz durante 5 minutos, sonicação com ressonância de 10 KHz por 5 minutos e choque osmótico com solução de cloreto de sódio a 10% no vórtice por 1 minuto. O conteúdo lipídico obtido foi de 5,4 a 11,9 para autoclave, 7,9 a 8,1 para colisão com esferas, 10,0 a 28,6 para micro-ondas, 6,1 a 8,8 para a técnica de ultrassom e 6,8 a 10,9 g/L para o choque osmótico. Nesse estudo, observou-se maior eficiência para o método de micro-ondas.

Em pesquisa similar, Prabakaran e Ravindran (2011) realizaram experimentos de extração lipídica para 0,5g de microalga utilizando um sonicador na frequência de 50 Hz durante 15 minutos. Em seus estudos, compararam essa técnica com o uso de autoclave, micro-ondas e o método de choque osmótico. Os resultados obtidos para a espécie *Chlorella sp.* indicou melhor rendimento para o banho de ultrassom com aproximadamente 0,2 g de teor lipídico.

5. Conclusões

O potencial de utilização de microalgas para a produção de biodiesel é um fato que tem adquirido atenção em estudos e pesquisas científicas. O número de referências relacionadas ao assunto tem possibilitado ampliar o conhecimento e buscar meios de adequação dessa tecnologia no mercado.

Para atingir aplicabilidade é necessário tornar o processo mais viável. A pouca massa resultante do cultivo restringiu o material a ser trabalhado e exigiu maior disponibilidade do que a própria extração de lipídio. Isso não foi um empecilho para a análise em escala laboratorial, mas para proporções maiores é necessário técnicas de cultivo mais eficientes.

Para o rompimento da membrana celular, a metodologia utilizando esferas de vidros se mostrou mais proveitosa, com um aumento em torno de 36,31%. As colisões proporcionadas pelas esferas tornou a extração de lipídio mais eficaz quando comparada ao banho de ultrassom.

A diferença de durabilidade de 5 e 10 minutos de agitação no vortex mostrou dados estatisticamente iguais, indicando que esses períodos alcançam resultados satisfatórios de óleo extraído e comprova a alta propensão dessa técnica para obtenção de lipídio de microalgas.

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

Com base nos resultados obtidos para a extração de lipídio da microalga *Chlorella minutíssima* sugere-se para trabalhos futuros:

- Avaliar novas metodologias de cultivo para maior rendimento de biomassa;
- Comparar outras técnicas de extração de lipídio com o método Bligh e Dyer adaptado utilizando esferas de vidro;
- Avaliar o desempenho da extração de lipídio com o método proposto para diferentes tempos de agitação e diâmetro de esferas.

Referências

AGROENERGIA EM REVISTA. Brasília: Embrapa Agroenergia, v. 10, dez. 2016.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis 2018.** Rio de Janeiro, RJ, 2018. 264p. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 11 de dezembro de 2018.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Diretoria Geral. Despacho nº 621, de 6 de agosto de 2019. O percentual mínimo de biodiesel a ser acrescido ao óleo diesel comercializado no país passará a 11%. **Diário Oficial da União:** Seção 1, p. 72, Brasília, DF, 07 de agosto de 2019.

ANSARI, F. A. et al. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 56, n. 12, p.3407-3412, 17 mar. 2017.

BASTOS, R. K.; FRIGO, E. P.; SANTOS, R. F.; MARTINEZ, D. G., MOREIRA, M. C. L.; ALVES, H. J. Biodiesel de Segunda Geração – **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p. 120- 131, 2015.

BLIGH, E. G; DYER, W. J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal do Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 911 - 917, 1959.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.557-577, fev. 2010.

CHAVES, A. J. **Cultivo de Chlorella sp. em fotobiorreatores enriquecidos com CO2 e avaliação da biomassa para a produção de biodiesel.** 2016. 92 f. Tese (Doutorado), Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, J. R.; **Advanced Biofuel Technologies: Status and Barriers.** Policy Research Working Paper, set. 2010. The World Bank Development Research Group Environment and Energy Team.

CHISTI, Y.; MURRAY, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme Microbiology Technologic.** Ontario, p. 194-204. Apr. 1986.

COLLARES, D. Apostila na pesquisa com microalgas. **Agroenergia em Revista: Microalgas**, Brasília, n. 10, p.4-54, 01 dez. 2016. Embrapa Agroenergia. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153095/1/Agroenergia-Revista-microalgas-ed10-red.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. **Microalgas, produtos e aplicações.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, dezembro de 2006. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n6/a50v36n6.pdf>>. Acesso em: 19 de março de 2019.

DERNER, R. B. **Sistemas de cultivos de microalgas – Parte I.** 2017. Disponível em: <<http://www.aquaculturebrasil.com/2017/12/06/sistemas-de-cultivo-de-microalgas-parte-i/>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2019.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**, [s.l.], v. 88, n. 10, p.3541-3547, out. 2011.

GOH, B. H. H. et al. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 107, p.59-74, jun. 2019.

GRIS, L. R. S. et al. **Produção de Microalgas em Fotobiorreator Airlift**. Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HEREDIA-ARROYO, TAMARYS, WEI., RUAN, R., BO HU. Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.2245-2253, maio 2011.

JENA, U.; VAIDYANATHAN, N.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Evaluation of microalgae cultivation using recovered aqueous co-product from thermochemical liquefaction of algal biomass, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3380-3387, 2011.

KIM, J. et al. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.862-876, nov. 2013.

LAIATE, J. **Estudo do Processo de Cultivo da Microalga Chlorella minutíssima e Caracterização Termoquímica de sua Biomassa para Aplicação em Gaseificação**. 2018. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2018.

LEE J-Y.; YOO C.; JUN S-Y.; AHN C-Y.; OH H-M.; Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, 101(S75–7), 2010.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 46, p.89-101, nov. 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 588 p.

LUPATINI, A. L. **Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica**. 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2016.

MME. Ministério de Minas e Energia. **Percentual obrigatório de biodiesel passa para 10%**. 2018. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticas/>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2019.

NATARAJAN, R. et al. Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 158, p.7-11, abr. 2014.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A.d.. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.150-154, 13 jun. 2011.

PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. Do Óleo de Amendoim ao Biodiesel - Histórico e Política Brasileira para o Uso Energético de Óleos e Gorduras. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.39-51, 2017.

RAMOS, Luiz P. et al. Biodiesel: Raw Materials, Production Technologies and Fuel Properties. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.317-369, 2017.

RASHID, N., REHMAN, M. S. U., SADIQ, M., MAHMOOD, T., HAN, J-I. Current Status, Issues and Developments in Microalgae Derived Biodiesel Production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 760 – 78. 2014

ROCHA, C. A. L. Cultivo de microalgas: dimensionamento de uma instalação do tipo *Raceways Pond*. 2016. 97 f. Tese (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Institututo Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2016.

RODWELL, V. W. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30.ed. Porto Alegre: AMGH, 2017. 832 p.

SHUBA, E. S.; KIFLES, D., Microalgae to biofuels: “Promising” alternative and renewable energy, review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 743-755, 2018.

SUALI, E., SARBATLY, R. Conversion of Microalgae to Biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p. 4316-42, 2012.

TAGLIAFERRO, G. V. et al. Continuous cultivation of *Chlorella minutissima* 26a in a tube-cylinder internal-loop airlift photobioreactor to support 3G biorefineries. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 130, p.439-445, jan. 2019.

TORRES, H. S. J. **Cultivo de microalgas em efluente de tratamento anaeróbio de esgoto**. 2014. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

UBRABIO. União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene. **Brasil começa a usar B10**. 2018. Disponível em: <<https://ubrabio.com.br/2018/03/01/brasil-comeca-a-usar-b10-2/>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

UBRABIO. União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene. **Percentual de biodiesel no Brasil agora é 11%. O que isso significa?** 2019. Disponível em: <<https://ubrabio.com.br/2019/08/07/percentual-minimo-de-biodiesel-agora-e-11-o-que-isso-significa/>>. Acesso em: 10 set. 2019.

VIEGAS, C. V. **Extração e Caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando a produção de ésteres graxos.** 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VEDANA, M. A. **Aumento da mistura de biodiesel do B11 ao B15 é aprovado.** BiodieselBR.com, 2018. Disponível em:
<https://www.biodieselbr.com/noticias/regulacao/politica/aumento-da-mistura-de-biodiesel-do-b11-ao-b15-e-aprovado>. Acesso em: 07 de março de 2019.