



Avaliação dos impactos induzidos por variadas condições de cultivo nas microalgas *Scenedesmus sp.* e *Chlorella sp.*, visando a intensificação do teor lipídico

Jaqueline Elise Garcia Chiesa¹, Witter Duarte Guerra²; Flávia Costa Oliveira³; Karolynne Gomes Albuquerque⁴; Alexandre de Matos Martins⁵; Lucas Matheus da Rocha⁶, Anizio Marcio de Faria⁷, Antônio Carlos Ferreira Batista⁸

Como Citar:

CHIESA, Jaqueline Elise Garcia; GUERRA, Witter Duarte; OLIVEIRA, Flávia Costa et al. Avaliação dos impactos induzidos por variadas condições de cultivo nas microalgas *Scenedesmus sp.* e *Chlorella sp.*, visando a intensificação do teor lipídico. Revista Sociedade Científica, vol.8, n. 1, p.159-187, 2025. <https://doi.org/10.61411/rsc202592718>

DOI: [10.61411/rsc202592718](https://doi.org/10.61411/rsc202592718)

Área do conhecimento: Biotecnologia.

Palavras-chaves: Microalgas; *Chlorella sp.*; *Scenedesmus sp.*; Lipídeos.

Publicado: 06 de janeiro de 2025.

Resumo

Biocombustíveis são comumente descritos como derivados de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica não fossilizada e produtos metabólicos de organismos vivos, como óleo vegetal para a produção de biodiesel. Entre as matérias-primas para biodiesel, as microalgas têm sido apontadas como uma alternativa promissora. Este estudo visa otimizar as condições de cultivo das microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*, analisando seu crescimento em diferentes concentrações de nitrato, ferro, zinco e biotina. O cultivo ocorreu em reatores planos horizontais em acrílico, com temperatura controlada entre 25 e 30°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro, utilizando meio sintético Chu. O experimento, baseado em um planejamento fatorial 23 e um planejamento composto central, indicou que a metodologia otimizada para *Chlorella sp.* resultou em um máximo de 51,54% de teor lipídico em 20 dias de cultivo. O estudo destaca a necessidade de continuar a busca por condições ideais de cultivo para aprimorar os resultados.

Evaluation of the impacts induced by various cultivation conditions on microalgae *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*, aiming to increase lipid content

Abstract

¹Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, Brasil. ✉

²Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, Brasil. ✉

³Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, Brasil. ✉

⁴Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara, Itumbiara, Brasil. ✉

⁵Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brasil. ✉

⁶Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, Brasil. ✉

⁷Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, Brasil. ✉

⁸Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, Brasil. ✉



Biofuels are commonly described as derived from biological materials, including non-fossilized organic matter and metabolic products of living organisms, such as vegetable oil for the production of biodiesel. Among the raw materials for biodiesel, microalgae have been identified as a promising alternative. This study aims to optimize the cultivation conditions of microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp., analyzing their growth in different concentrations of nitrate, iron, zinc and biotin. The cultivation took place in horizontal flat acrylic reactors, with a controlled temperature between 25 and 30°C, a photoperiod of 12 hours of light and darkness, using synthetic Chu medium. The experiment, based on a 23 factorial design and a central composite design, indicated that the methodology optimized for *Chlorella* sp. resulted in a maximum of 51.54% lipid content in 20 days of cultivation. The study highlights the need to continue the search for ideal growing conditions to improve results.

Keywords: *Chlorella* sp., microalgae, *Scenedesmus* sp., lipids.

1. Introdução

A persistente dependência dos combustíveis fósseis como a principal fonte de energia em diversas atividades humanas representa um dos maiores desafios enfrentados pela humanidade. Diante da finitude desses recursos, a inevitável escassez dos combustíveis fósseis impulsiona a busca por fontes alternativas de energia, visando a redução do impacto ambiental. [1]

A necessidade de limitar a emissão de gases de efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global e suas consequências prejudiciais para a humanidade, implica na gradual substituição das atuais fontes de energia por alternativas. [2]

Nesse contexto, surge o biocombustível, comumente definido como um combustível derivado de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica não fossilizada e proveniente de produtos metabólicos de organismos vivos, como o óleo vegetal usado na produção de biodiesel. [2]



Em linhas gerais, o conceito de biocombustível abrange tanto formas sólidas quanto líquidas e gasosas. Exemplos de biocombustíveis sólidos incluem madeira e resíduos agrícolas, como casca de arroz. Entre os líquidos, destacam-se o etanol, obtido pela fermentação alcoólica da cana de açúcar, e o biodiesel, produzido a partir de diversos óleos vegetais, como soja, amendoim e sebo bovino [3]

Contudo, surge uma preocupação amplamente debatida em relação aos biocombustíveis, que se refere à competição entre combustíveis e alimentos. Argumenta-se que há uma disputa por áreas entre a produção de alimentos e a expansão dos biocombustíveis, com estes últimos ganhando terreno em detrimento dos primeiros. Um aspecto crucial na avaliação da sustentabilidade dos biocombustíveis é o problema do desmatamento, especialmente em nações com florestas tropicais que estão sendo desmatadas para dar espaço a plantações destinadas à produção de energia [4].

Diante disso, a biomassa, representada por matéria orgânica continuamente renovável, como cereais, árvores, algas e resíduos de origem vegetal e animal, destaca-se como uma das possíveis. [2] Nesse cenário, o emprego de microalgas como biomassa para a produção de biodiesel e outros derivados emerge como uma alternativa promissora, evidenciando vantagens significativas em comparação a outras matérias-primas.

No entanto, a implementação de um processo comercial viável para a produção de biocombustíveis à base de algas enfrenta diversos desafios e barreiras técnicas. Os biocombustíveis derivados de microalgas demandam uma intrincada sequência de processos unitários, incluindo cultivo, colheita, desidratação, extração de óleo, conversão e outras etapas, resultando em custos elevados de produção. Diante desse cenário, o presente estudo explora alternativas nas condições de cultivo que possam maximizar a produção e reduzir os custos associados [5]

Como objetivo geral, este trabalho visa otimizar as condições de cultivo das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. para maximizar a produção lipídica,



visando viabilizar a produção em larga escala de biodiesel. Os objetivos específicos são: Avaliar se as diferentes espécies de microalgas apresentam rendimentos distintos quando submetidas às mesmas condições de cultivo; Determinar se um período de cultivo de 30 dias é o mais adequado para essas espécies nas condições estabelecidas; Analisar o rendimento de óleo ao adicionar a vitamina biotina em diferentes concentrações ao meio de cultivo; Verificar o rendimento em teor lipídico das microalgas quando expostas a diferentes concentrações de nitrato, ferro e zinco em seu meio.

2. Metodologia

2.1 Microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. e meio de cultivo

As linhagens das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. foram isoladas e preservadas no LEMARC, Laboratório de Energias Renováveis, Materiais e Catálise, no Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (Química) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todas as operações de manutenção e testes experimentais foram conduzidas em condições controladas, detalhadas nos itens a seguir, após um rigoroso processo de lavagem envolvendo álcool e água destilada. Após a esterilização dos recipientes, deu-se início ao cultivo de ambas as espécies.

Para o crescimento das microalgas, é essencial um meio suplementado, sendo empregado o meio sintético Chu (conforme apresentado na Tabela 1) durante o cultivo e a manutenção. Em busca de otimizar as condições de produção da biomassa algal, o meio foi preparado em quatro distintas condições: 150% de nitrato, 30% de nitrato, 150% de ferro e 200% de ferro em relação ao meio Chu. Cada solução foi preparada com as concentrações (g/L) específicas de cada reagente para cada litro do meio, conforme detalhado por [6].



Tabela 1 – Biomassa úmida.

REAGENTE	FÓRMULA	QUANTIDADE (g/L)
Nitrato de sódio	NaNO ₃	0,25
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	0,075
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	0,175
Cloreto de sódio	NaCl	0.025
Sal de EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	0,05
Hidróxido de potássio	KOH	0,031
Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄	0,00498
Acido bórico	H ₃ BO ₃	0,01142
Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 10 ⁻⁶
Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 10 ⁻⁶
Molibdato de sódio	NaMoO ₄ .2H ₂ O	1,19 10 ⁻⁶
Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 10 ⁻⁶
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 10 ⁻⁶

Fonte: Autores (2024).

Diferentes concentrações de nitrato e ferro foram adotadas com o objetivo de avaliar qual delas resultaria no melhor crescimento em biomassa e, especialmente, na maior porcentagem de lipídios nas microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. Para isso, quatro soluções estoque foram preparadas: cada reagente foi pesado separadamente, transferido para balões volumétricos de 1 L e, por fim, diluído com água destilada. Essas soluções foram armazenadas em frascos âmbar na sala de cultivo, mantendo-se por até 1 ano a uma temperatura ambiente em torno de 25°C.

2.2 Condições de cultivo

O cultivo foi conduzido em reatores horizontais do tipo bandeja aberta, fabricados em acrílico e com um volume útil de 1 litro. Esses reatores foram hermeticamente fechados com filme plástico de PVC, apresentando perfurações aleatórias para facilitar a oxigenação e reduzir a evaporação. O ambiente de cultivo foi mantido a uma temperatura ambiente próxima a 25°C, com um controlador de fotoperíodo configurado para 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Durante o período de 30 dias, a iluminação foi fornecida por três lâmpadas fluorescentes brancas



de 40 volts, seguindo um arranjo semelhante à unidade experimental descrita por Ramirez (2013).

2.3 **Leitura de crescimento celular e biomassa seca**

As medições de densidade ótica foram realizadas em triplicata a cada 7 dias para cada alíquota de cultivo, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 e um comprimento de onda de 570 nm. As análises de massa seca e densidade celular foram conduzidas para determinar a quantidade de biomassa produzida. A relação entre a absorbância e a porcentagem de massa seca permitiu a construção da curva analítica para a determinação do teor de lipídios nos experimentos do planejamento experimental.

Para a colheita da biomassa e a determinação de sua massa seca (g), o conteúdo total de cada reator foi submetido à centrifugação em um equipamento da marca AAKER, a uma rotação de 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, composto pelo meio de cultivo, foi descartado, e o sedimento de biomassa foi reservado em um béquer previamente pesado. Esse sedimento foi levado para secagem em estufa a 80°C por 48 horas. Para quantificar a biomassa seca final expressa em g/L, as amostras foram pesadas seguindo a metodologia indicada por Ramirez (2013).

As microalgas selecionadas e os nutrientes incorporados ao meio representam variáveis cruciais para o crescimento das algas e a obtenção de lipídios visando a produção de biodiesel. Com esse propósito, os experimentos foram planejados para maximizar a produção significativa de lipídios. O delineamento experimental adotado foi o planejamento fatorial 2^3 , conforme detalhado na Tabela 2, que apresenta cada um dos fatores analisados durante o cultivo.



Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados para a otimização do processo de produção frente ao cultivo de microalgas.

	Variável	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
E.M	Espécie de Microalga	<i>Scenedesmus sp</i>	<i>Chlorella sp</i>
N	Nitrato	0,375g/L	0,075g/L
F	Ferro	0,0075g/L	0,01g/L

Fonte: Autores (2024).

Com base nas variáveis escolhidas e seus níveis, elaborou-se a matriz do planejamento fatorial 2³, que destaca a combinação de todas as condições experimentais para o cultivo das algas. A Tabela 3 exibe a matriz do planejamento dos experimentos, executados para aprimorar a viabilidade do processo de cultivo das algas.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2³, para variações no meio de Cultivo. Variáveis: M: Meio de Cultivo, T: Tempo de cultivo em dias e I: Porcentagem de Inóculo.

Ensaio	Variáveis		
	E.M	N	F
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: Autores (2023).

2.4 Extração de Lipídeos segundo Folch Less e Sloane Stanley

Após a colheita da biomassa, seguida de centrifugação e secagem, uma amostra de aproximadamente 1000 mg passou por um processo de extração de lipídios conforme a metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957). Inicialmente, a massa seca foi macerada em um cadinho de porcelana com a adição de 20 mL de clorofórmio e



10 mL de metanol. Posteriormente, a mistura foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL e submetida a três ciclos de sonicação, cada um com duração de 30 minutos, em um banho ultrassônico (QUIMIS - Ultrasonic Cleaner 1400, frequência de 40 kHz), visando auxiliar na ruptura celular. Após esse processo, a amostra foi encaminhada para centrifugação.

Após os ciclos de centrifugação de 8 minutos, a parte sólida da amostra sedimentou-se, e o sobrenadante contendo os lipídios foi extraído e transferido para um béquer de 200 mL, contendo uma solução de 12 mL de KCl. Esse líquido foi agitado e encaminhado para um funil de separação. Após a formação de duas fases, a fase que continha os lipídios foi reservada, e 4 mL de uma mistura de metanol/água na proporção 1:1 foram adicionados ao funil, que foi novamente agitado. A fase superior foi retirada por sucção usando uma pipeta graduada e descartada, enquanto a fase inferior, que continha os lipídios, foi recuperada e submetida à secagem com sulfato de magnésio. Em seguida, foi transferida para um balão volumétrico e exposta a uma capela de exaustão para a completa evaporação dos solventes.

Posteriormente, a massa dos frascos contendo o óleo produzido em cada reator, com um volume útil de 1 litro, foi aferida para possibilitar o cálculo gravimétrico e obter a medida do teor lipídico total em porcentagem, conforme a equação 1:

$$TL(\%) = (MO / MB) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: TL: teor de lipídeos, expressa em porcentagem (%); MO: massa de óleo produzida, expressa em gramas (g); MB: massa da biomassa, presente em 1 L de meio de cultivo (g).

2.5 Otimização das condições de cultivo

Através do planejamento fatorial 2^3 , foi possível identificar as variáveis incorporadas ao meio de cultivo que proporcionaram os melhores resultados para a



produção de biomassa (expressa em g/L) e óleo (indicando o teor lipídico em porcentagem mássica). Este planejamento visava selecionar os parâmetros qualitativos que demonstraram um desempenho superior em relação às variáveis estudadas, a fim de serem utilizados em um segundo plano quantitativo, o Planejamento Composto Central.

O emprego do planejamento fatorial exigiu diversas combinações dos níveis dos fatores estudados, utilizando o planejamento de experimentos 2^2 . Esse processo permitiu a obtenção de dados que resultaram em uma matriz destacando o melhor desempenho das variáveis de resposta, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e curvas de contorno (GOES, 2018).

O Planejamento Composto Central (PCC) foi executado com duas variáveis, resultando em 11 experimentos distribuídos entre os níveis dos fatores de interesse. Essa configuração incluiu 4 pontos cúbicos (+1 e -1), 4 pontos axiais (+ α e - α) e 3 repetições no ponto central. As variáveis analisadas foram a concentração de zinco no meio Chu (%) e a inserção de biotina em diferentes concentrações. O teor de lipídeos, determinado pelo método de extração de Folch, Lees e Stanley (1956), foi a variável resposta nos planejamentos.

A Tabela 4 apresenta as variáveis e os níveis avaliados durante a otimização da extração, enquanto a Tabela 5 representa a matriz de contraste das variáveis codificadas.

Tabela 4 - Variáveis e níveis da otimização do teor lipídico

Variável	Nível				
	-1,41	-	0	+	1,4
(1) Zinco	0,3g	0,5g	1,0g	1,5g	1,7g
(2) Biotina	0,075g	0,125g	0,25g	0,375g	0,425g

Fonte: Autores (2024).

Tabela 5 - Matriz de planejamento composto central em 2 variáveis para otimização do teor lipídico (1- Concentração de zinco no meio Chu em porcentagem (%) e 2 – inserção de biotina em diferentes concentrações.



Ensaio	Valor codificado A	Valor codificado B	ZINCO	BIOTINA
1	-	-	0,5	0,125
2	+	-	1,5	0,125
3	-	+	0,5	0,375
4	+	+	1,5	0,375
5	0	0	1,0	0,25
6	0	0	1,0	0,25
7	0	0	1,0	0,25
8	- 1,4	0	0,3	0,25
9	+ 1,4	0	1,7	0,25
10	0	-	1,0	0,075
11	0	+1,4	1,0	0,425

Fonte: Autores (2024)

As análises estatísticas foram conduzidas por meio do software Statistica 7.1 da StatSoft. Utilizando conceitos de estatística descritiva, análise multivariada e metodologia de superfície de resposta, foram exploradas as variáveis que influenciam determinadas respostas. Após a conclusão de todas as análises mencionadas, a faixa ótima de cada variável foi identificada.

3. Desenvolvimento e discussão

3.1 Avaliação do crescimento das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.

Os processos metabólicos exercem uma influência direta sobre o crescimento das microalgas, podendo ocasionar alterações nas propriedades químicas e características morfológicas desses organismos. Diante desse cenário, torna-se imperativo avaliar o crescimento das espécies, acompanhando seu desenvolvimento por meio de análises de densidade óptica através da espectroscopia eletrônica [7]

Devido ao seu ciclo de vida rápido, as microalgas superam outras matérias-primas em termos de vantagem competitiva. Considerando essa superioridade, é essencial explorar métodos que facilitem as análises de crescimento microalgal,

proporcionando um entendimento mais aprofundado da velocidade de reprodução diante das variáveis presentes no ambiente de cultivo. [8]

O crescimento celular de todos os ensaios foi monitorado a cada sete dias por meio da absorvância a 570 nm, analisando a densidade óptica. Nesse contexto, a Figura 8 oferece uma representação visual do perfil de crescimento das algas em termos de absorvância.

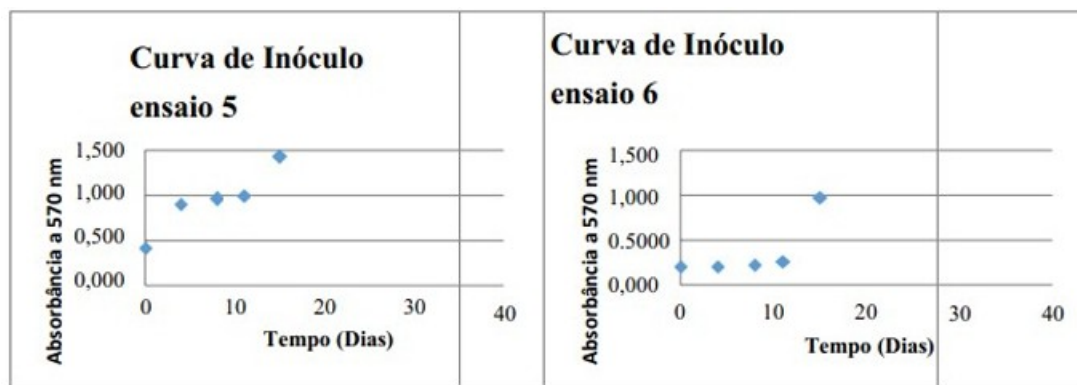


Figura 8 – Análise de Crescimento celular. Fonte: Autores, 2024.

A análise da densidade celular das microalgas revelou uma fase de crescimento progressivo em todos os experimentos. No entanto, destaca-se que o aumento percentual é mais expressivo entre os 15 e 20 dias de cultivo, especialmente observado nos ensaios 5 e 6, que foram submetidos às mesmas condições de cultivo. Importante ressaltar que todos os ensaios foram conduzidos ao longo de um período de 30 dias, apresentando, em média, resultados semelhantes. Diante desse panorama, a análise do crescimento celular sugere que 20 dias seria o período mais adequado para dar continuidade ao experimento, pois após esse intervalo, há a possibilidade de iniciar um decréscimo na densidade celular devido ao elevado consumo de nutrientes pelas algas.

O estudo de [7] constatou que, em um período de 16 dias, houve uma produção de biomassa de 1,94 g/L. Observou-se que a microalga *Scenedesmus* sp., após a fase de crescimento linear (dias 10-25), pode apresentar um declínio na densidade celular.



Borges ao concluir seu cultivo de 22 dias, registrou uma biomassa microalgal de 0,244 g/L. Seus estudos destacam a importância de maximizar a fase estacionária da cultura entre os dias 10-16 e 22-30 para obter um melhor acúmulo lipídico nas células da alga *Scenedesmus* sp., impedindo que, após o consumo dos nutrientes do meio de cultivo, ela utilize suas reservas energéticas para continuar o período de crescimento. [9]

3.2 Avaliação do teor lipídico das variáveis selecionadas

A biomassa gerada pelos meios de cultivo foi submetida a centrifugação e secagem, seguindo a metodologia delineada por Folch visando a extração do óleo. Posteriormente, a massa dos frascos contendo o óleo produzido foi mensurada para permitir o cálculo gravimétrico, resultando, ao final do procedimento metodológico, na determinação do teor lipídico total em porcentagem. [10]

O objetivo da metodologia de cultivo investigada foi avaliar se as variáveis selecionadas exercem influência na formação de lipídios nas microalgas. Vale ressaltar que as três variáveis escolhidas foram as espécies de microalgas, a concentração de nitrato e a concentração de ferro, com a aplicação de dois níveis para cada variável.

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento, incluindo as interações entre as variáveis. Isso permite analisar a influência de cada variável na resposta medida, que é o teor de lipídeos.



Tabela 10 - Porcentagem de teor lipídico de acordo com o planejamento fatorial 2³ (Autores, 2024)

Ensaio	Variáveis							% T.L
	E	N	F	ExN	ExF	NxF	ExNxF	
1	-	-	-	+	+	+	-	7,04
2	+	-	-	-	-	+	+	15,04
3	-	+	-	-	+	-	+	9,34
4	+	+	-	+	-	-	-	13,41
5	-	-	+	+	-	-	+	9,50
6	+	-	+	-	+	-	-	5,08
7	-	+	+	-	-	+	-	4,82
8	+	+	+	+	+	+	+	20,19

Fonte: Autores (2024).

Ao examinar a variável ferro nos ensaios 1 e 5, nos quais ambos foram conduzidos com a mesma espécie de microalga e concentração de nitrato, variando apenas a concentração de ferro, observa-se que o ensaio 5 apresentou uma porcentagem mais elevada de teor lipídico, indicando uma correlação positiva com a maior quantidade de ferro.

Essa tendência é corroborada ao analisar os ensaios 4 e 8, nos quais ambos foram submetidos à mesma espécie de microalga (*Chlorella* sp.) com uma concentração de nitrato de 30%, variando apenas a concentração de ferro. O ensaio 8, sujeito à maior concentração de ferro, demonstrou a maior porcentagem de teor lipídico.

Para avaliar os efeitos das variáveis em cada ensaio com base nos resultados do teor de lipídios, calculou-se os efeitos médios para cada variável em cada nível. Esses efeitos foram determinados pela média aritmética das porcentagens de lipídios para cada variável e em cada nível, aplicando o resultado na equação 2 abaixo:

$$Ef = R(+)-R(-)$$



O teor de lipídios obtido para o experimento conduzido em um nível positivo (+) de uma determinada variável é representado por % TL (+), enquanto % TL (-) denota o teor de lipídios obtido para o experimento realizado em um nível negativo (-) dessa variável. A equação foi aplicada individualmente para cada variável analisada. Os valores de efeito correspondentes estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Efeitos das variáveis estudadas e suas interações.

	Variáveis	Efeitos
1	Espécies de microalga	+ 6,03
2	Nitrato	+ 2,51
3	Ferro	-1,22
12	Espécies x Nitrato	+3,69
13	Espécie x Ferro	-0,19
23	Nitrato x Ferro	+2,35
123	Espécie x Nitrato x Ferro	+5,84

Fonte: Autores (2024).

Com base nos valores de efeito, constatou-se que as espécies de microalgas desempenharam um papel mais significativo no cultivo. O efeito de +2,51 indica que o aumento da concentração de nitrato de 30% para 150% resulta em um acréscimo de 2,51 g/L no teor de lipídios. Assim, um teor lipídico mais elevado torna-se mais interessante para a produção de biodiesel. Em relação aos efeitos negativos, observou-se que apresentam menor significância no teor lipídico.

Como os experimentos não foram replicados, a estimativa do erro dos efeitos não pôde ser obtida a partir das variâncias individuais dos experimentos. No entanto, há uma alternativa para estimar o erro dos efeitos por meio da análise do gráfico normal



dos efeitos. Neste gráfico, os efeitos mais dispersos de um valor padronizado (Z) igual a zero são considerados estatisticamente significativos.

A construção do gráfico normal de efeitos envolveu o cálculo das interações entre os fatores, resultando em sete efeitos no total: três efeitos principais, três interações de dois fatores e uma interação de três fatores. Para calcular os efeitos de interação das variáveis, realizou-se a multiplicação dos sinais dos níveis elemento por elemento. Inicialmente, as interações das variáveis foram determinadas pela multiplicação dos níveis de duas em duas e, posteriormente, de três em três variáveis [11]

A significância dos efeitos pode ser mais bem observada por meio do gráfico normal dos efeitos, conforme ilustrado na Figura 8.

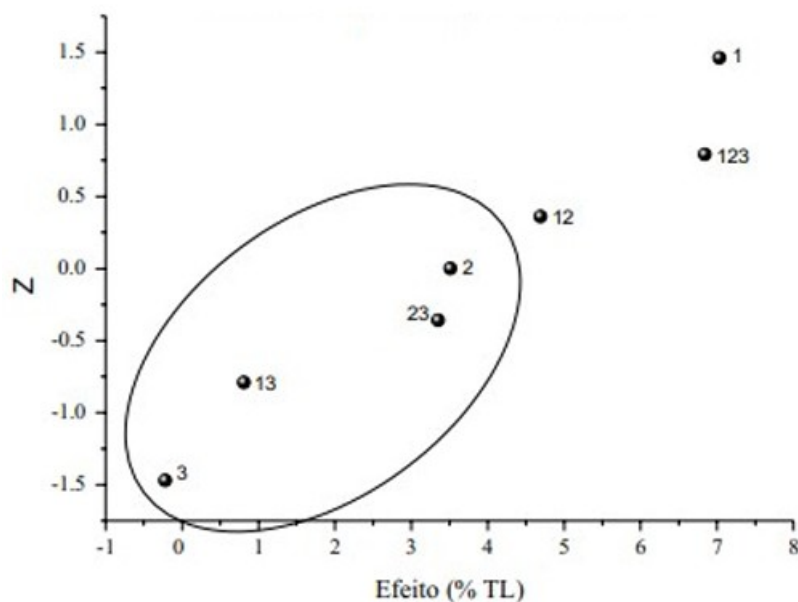


Figura 8 - Gráfico normal de efeitos para o cultivo das algas. Sendo que 1 corresponde ao meio de cultivo, 2 ao tempo de cultivo e 3 à porcentagem de inóculo. (Autores, 2024).

Os efeitos cujos valores se afastam mais de zero são considerados estatisticamente significativos, enquanto aqueles que se aproximam desse valor exercem



menor influência na resposta. Por exemplo, as variáveis 3,13, 23 e 2 apresentaram pouca influência no teor de lipídios. Os efeitos mais expressivos para a resposta foram 12, 123 e 1. No entanto, como os valores compostos têm menor impacto do que uma variável pura, pode-se afirmar que o efeito 1 (Espécie de microalga) foi o mais determinante nos resultados obtidos (% TL).

Ao analisar os gráficos anteriores, é possível observar que, dentro da variável espécie, a *Chlorella* sp. alcançou a maior porcentagem na produção de lipídios. Esses resultados indicam que a espécie *Chlorella* sp. foi a que melhor se adaptou ao ambiente de cultivo, resultando em uma produção mais elevada de teor lipídico.

3.3 Biomassa seca e teor lipídico produzido

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12, a qual reflete uma variedade de variáveis que foram investigadas para analisar o crescimento das microalgas. Foram utilizadas duas espécies diferentes de microalgas (*Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.), duas concentrações de nitrato (30% e 150%), e duas concentrações de ferro (150% e 200%). Esses fatores foram avaliados em ensaios distintos, seguindo um plano fatorial aleatório.

Tabela 12 - Biomassa seca e quantidade de óleo produzido por reator e teor lipídico. Autores, 2024.

	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor Lipídico (%)
Ensaio 1	0,9714	0,0684	7,04
Ensaio 2	0,53772	0,0828	15,4
Ensaio 3	0,8918	0,0833	9,34
Ensaio 4	0,9802	0,1315	13,41
Ensaio 5	1,4233	0,1353	9,50
Ensaio 6	1,8427	0,1076	5,8
Ensaio 7	0,7061	0,0341	4,82
Ensaio 8	2,3628	0,4771	20,19

Fonte: Autores (2024).



O cultivo de microalgas em diversas condições geralmente resulta em respostas variadas, especialmente quando se consideram diferentes concentrações de nitrato e ferro. [12]

Em média, os melhores resultados em termos de produção de óleo foram observados na variante da espécie de microalga *Chlorella* sp. Além disso, o teor máximo de lipídios foi verificado no ensaio 8, no qual *Chlorella* sp. foi cultivada em meio sintético Chu com uma redução de 30% no nitrato. [12]

Singh et al. (2014) explicam que o nitrato é um nutriente crucial para o crescimento das microalgas, e sua deficiência interrompe o ciclo normal, levando as células a redirecionar o metabolismo para a síntese de lipídios. Isso pode justificar os valores mais altos encontrados na variável nitrato quando submetida a uma diminuição de 30%. [13]

Silva, em sua pesquisa, também observou que a condição de depleção de nitrato resultou em menor crescimento celular, mas concentrações mais elevadas de lipídios, relevantes para a produção de biodiesel. Além disso, com maior concentração de ferro, o crescimento celular aumentou, tornando-se a segunda melhor condição para a produção de ácido oleico e ácido palmítico. [14]

Por outro lado, ao analisar a variável da espécie de microalga *Scenedesmus* sp., pode-se notar que os ensaios com depleção de nitrato apresentaram o menor percentual de teor lipídico. Em contraste, os melhores resultados para *Scenedesmus* sp. ocorreram nos ensaios em que houve aumento de nitrato, como evidenciado nos ensaios 1 e 8. Isso sugere que a espécie *Scenedesmus* sp. não se adaptou à condição de depleção desse nutriente.

Autores que cultivaram *Scenedesmus* sp. com aumento de nitrato em seu meio BG11N e observaram um aumento significativo no acúmulo lipídico, cerca de 2,6 vezes maior do que nos outros meios testados. [15]

3.4 Otimização das condições de cultivo

Com base nos resultados obtidos, a pesquisa avançará para a otimização do meio de cultivo, concentrando-se exclusivamente na espécie de microalga *Chlorella* sp. com uma redução de nitrato para 30%, conforme estabelecido pelos valores do meio sintético Chu, e um tempo de cultivo de 20 dias. Essa abordagem visa alcançar uma produção mais elevada de teor lipídico extraído das microalgas.

Na próxima etapa, serão avaliadas as seguintes variáveis: a concentração de zinco no meio Chu (%) e diferentes concentrações de biotina. Conforme detalhado na Tabela 13, serão conduzidos experimentos baseados em um planejamento estatístico do tipo Planejamento Composto Central (PCCR).

Tabela 13– Biomassa seca, quantidade de óleo produzido e teor lipídico das microalgas *Chlorella* sp. em processo de otimização de cultivo. Autores, 2024.

	Biomassa (g/L)	Óleo (g)	Teor Lipídico (%)
Ensaio 1	0,9710	0,0781	8,04%
Ensaio 2	0,4211	0,0226	6,14%
Ensaio 3	0,3581	0,1527	42,64%
Ensaio 4	0,9987	0,1346	13,47%
Ensaio 5	2,4621	0,4617	18,75%
Ensaio 6	1,0602	0,0956	14,93%
Ensaio 7	0,8131	0,1121	13,78%
Ensaio 8	0,8215	0,3214	39,12%
Ensaio 9	0,0831	0,0031	3,73%
Ensaio 10	1,8318	0,1125	5,36%
Ensaio 11	1,2652	0,6521	51,54%

Fonte: Autores (2024).

Através do modelo estatístico, as respostas obtidas incluíram o teor de lipídios, expresso em porcentagem, a quantidade de óleo produzido em gramas e a biomassa seca em gramas por litro. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata, ao longo de um período de 20 dias, e os resultados apresentados representam a média dos valores obtidos.

Modelo estatístico:



$$y = 15,82 - 10,14x_1 + 13,40x_2 + 0,96x_1^2 + 4,47x_2^2 - 6,82x_1x_2$$

$$\pm 1,50 \quad \pm 0,92 \pm 0,92 \pm 1,09 \pm 1,09 \pm 1,30$$

Onde: x_1 representa o valor codificado para o zinco e x_2 é o valor codificado para a biotina. A adequação do modelo foi avaliada por meio da Análise de Variância (ANOVA), conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14- Análise de variância para o modelo estatístico ajustado ao teor de lipídeos obtido na produção da alga *Chlorella* sp. Autores, 2024.

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	Nº G.L.	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	2.559,76	5	511,95	
RESÍDUOS	235,37	5	47,07	
FALTA DE AJUSTE	221,83	3	73,94	10,92
ERRO PURO	13,54	2	6,77	
TOTAL	2795,13	10		
% de variação explicável (R ²)	99,52			
% de variação explicada (R ² ajustado)	91,58			

Fonte: Autores (2024).

Conforme a ANOVA, 99,52% da variação observada no experimento pode ser explicada pelo modelo estatístico da Equação 1. Essa constatação indica um bom ajuste do modelo ao processo de obtenção do teor lipídico da microalga *Chlorella* sp. Adicionalmente, o modelo não evidenciou falta de ajuste com base no teste F, uma vez que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} foi de 10,92, enquanto o valor crítico de F foi de 19,16. Em outras palavras, $MQ_{faj}/MQ_{ep} < F_{3,2,95\%}$ a um nível de confiança de 95%. O modelo estatístico desenvolvido para a produção lipídica da microalga *Chlorella* sp. resultou na superfície de resposta representada na Figura 9.

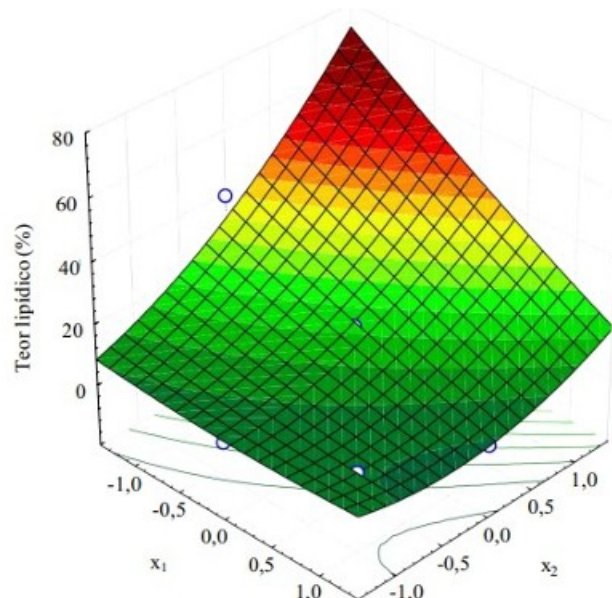


Figura 9- Superfície de respostas para o teor lipídico produzido por algas *Chlorella* sp. obtida seguindo o planejamento composto central. x_1 é o valor codificado para zinco e x_2 é o valor codificado para biotina

Conforme evidenciado pela Figura 9 da superfície de respostas, o teor lipídico mais elevado para as microalgas *Chlorella* sp. é alcançado quando o valor de x_1 se aproxima de -1,4 e x_2 se aproxima de +1,4. Isso sugere que baixas concentrações de zinco e altas concentrações de biotina correspondem a valores experimentais favoráveis para a produção lipídica.

Os ensaios 3 e 4, nos quais o ensaio 3 foi submetido a uma menor concentração de zinco, apresentaram uma maior produção de teor lipídico. Da mesma forma, nos ensaios 2 e 4, em que o ensaio 4 foi submetido à maior quantidade de biotina, foi observada uma maior porcentagem na produção de lipídios.

Verificou-se que a concentração de nutrientes desempenha um papel significativo na resposta, já que o acúmulo de lipídios atinge o máximo quando a concentração de biotina é de 170%, resultando em uma porcentagem máxima de teor lipídico de 51,54%. Para concentrações inferiores de biotina, o modelo prevê uma



redução no acúmulo de lipídios, como observado nos ensaios 1, 2 e 10, quando inseridos em baixas concentrações de biotina, resultando em uma redução no acúmulo de lipídios.

Ao longo da fase de crescimento celular constante, a disponibilidade de nutrientes influencia diretamente a constituição bioquímica das microalgas. Porcentagens mais baixas no meio nutricional levam a taxas mais elevadas de teor lipídico devido à perda da multiplicação celular, permitindo o acúmulo de energia na forma de lipídios [16]

Trevisan, avaliando a influência da concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo), obteve rendimentos de teor lipídico entre 12,7% e 17,9%, destacando que a restrição nutricional resulta em porcentagens elevadas de lipídios. [16]

Observou-se que o melhor resultado para a variável zinco ocorreu em concentrações mais baixas, resultando em porcentagens de teor lipídico de 42,64% e 39,12%. Considerando os custos do meio nutricional para o cultivo de microalgas, um dos fatores limitantes para a produção e conversão em biodiesel. Pesquisadores cultivaram *Chlorella* sp. em meio Chu com redução de nutrientes, obtendo 41% de lipídios totais. [17]

Hakalin também observou que a densidade celular em biomassa foi diretamente influenciada pelas concentrações de nutrientes. Ao comparar dois meios distintos, com 38% menos nutrientes e adição de vitamina, foi possível aumentar em 55% o teor lipídico.[18]

Em relação à produção de biodiesel utilizando biomassa microalgal, é crucial que o cultivo apresente um alto rendimento lipídico. Guarieiro (2019) desenvolveu uma metodologia com variação na concentração de nutrientes, adicionando um efluente proveniente da produção de óleo de palma, alcançando uma produção de 11,21% com 2,12 g L⁻¹ de conteúdo lipídico.



A porcentagem lipídica extraída do experimento demonstrou-se satisfatória, variando de 20,19% a 51,54%, comparada à literatura, em que a microalga *Chlorella* sp., por exemplo, apresenta entre 31,2% e 54,7% de lipídios, conforme autores como. [18]

No entanto, para dar continuidade a essa pesquisa, é essencial implementar constante aeração, novas técnicas de extração mais aprimoradas e meios de cultivo mais adequados e atualizados, de acordo com a literatura, visando melhorar ainda mais as condições de cultivo e obter resultados mais promissores, com redução de custos e homogeneidade [19].

4. **Considerações finais**

A pesquisa permitiu a estimativa das melhores condições de cultivo, testando duas espécies distintas de microalgas, *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., com diferentes concentrações de nitrato, ferro, zinco e adição de biotina no meio sintético Chu.

Entre os resultados preliminares, destaca-se que a microalga *Chlorella* sp. apresentou melhor adaptação em todas as condições avaliadas, obtendo os melhores resultados quando cultivada com redução da variável nitrato, resultando em um rendimento de 20,19% em teor lipídico.

Observando a variável ferro, de acordo com os valores negativos na tabela de efeitos, fica evidente que quanto maior a concentração de ferro no meio de cultivo, menor será a obtenção do teor lipídico na biomassa produzida pelas microalgas. Isso sugere que as espécies de microalgas não se adaptaram ao aumento de ferro.

Na primeira etapa do experimento, a leitura de crescimento celular indicou que, em geral, os ensaios apresentaram maior crescimento entre o décimo quinto e o vigésimo dia. Concluiu-se que 20 dias seria o período mais indicado para dar continuidade à pesquisa, uma vez que após esse período poderia ocorrer um decréscimo celular devido ao alto consumo de nutrientes pelas algas.



Na última etapa da pesquisa, foram avaliadas as variáveis de concentração de zinco no meio Chu (%) e diferentes concentrações de biotina, seguindo um planejamento estatístico do tipo planejamento composto central (PCCR).

De acordo com a superfície de resposta, o maior teor lipídico para as microalgas *Chlorella* sp. foi obtido quando a concentração de zinco (x1) foi próxima de 30% e a concentração de biotina (x2) próxima a 170%. Isso implica que concentrações mais baixas de zinco e maiores de biotina correspondem a valores experimentais favoráveis para a produção lipídica.

A porcentagem lipídica extraída do experimento mostrou-se satisfatória, variando de 20,19% a 51,54%, evidenciando que a otimização do meio de cultivo contribuiu para o aumento da produção de lipídios.

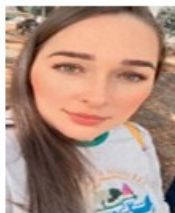
No contexto geral, destaca-se que a redução de nitrato, zinco e a inserção de biotina podem ter efeitos significativos na produtividade de lipídios, possibilitando redução de custos de produção e aproximando ainda mais a utilização dessa matéria-prima para a produção e comercialização de biodiesel.

Entretanto, para avançar nesta pesquisa, é necessário aprimorar a otimização, considerando o uso de constante aeração, implementação de novas técnicas de extração mais aprimoradas e a utilização de meios de cultivo mais adequados e atualizados de acordo com a literatura. Isso permitirá obter resultados ainda mais promissores, contribuindo para a eficiência e viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas.

5. **Agradecimentos**

Os autores expressam sua gratidão pelo suporte financeiro provido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com o código de financiamento 001.

6. **Biografias(s)**



Jaqueline Elise Garcia Chiesa

Mestra em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis pela Universidade Federal de Uberlândia. Graduada em Ciências Biológicas pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara.

<http://lattes.cnpq.br/9771109665383009>

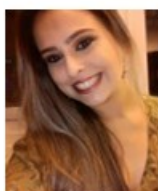


Witter Duate Guerra

Doutor em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis, possuindo também uma titulação de mestre na mesma área pela Universidade Federal de Uberlândia. Especialista em Genética de Microrganismos e Biotecnologia, além de possuir graduação em Ciências Biológicas pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara.

<http://lattes.cnpq.br/8951821384232273>

<https://orcid.org/0000-0002-9155-8047>



Flávia Oliveira Costa

Mestra em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis pela Universidade Federal de Uberlândia. Graduada em Ciências Biológicas pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara.

<http://lattes.cnpq.br/2210096662159421>



Karolynne Gomes Albuquerque

Graduada em Ciências Biológicas pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara.

<http://lattes.cnpq.br/9771109665383009>



Alexandre Matos Martins

Engenheiro Agrônomo, graduado pela Universidade Estadual de Montes Claros; Doutorando em Biocombustíveis - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Mestre em Produção Vegetal - Universidade Federal de São João Del-Rey; Especialista em Gestão e Manejo Ambiental pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

<http://lattes.cnpq.br/7255938195800617>



Lucas Matheus da Rocha

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora, com Mestrado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e Doutorado em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (2011). Atualmente é Professor Associado do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal - Campus Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

<http://lattes.cnpq.br/2684055663213328>



Bacharel e licenciado em Química pela Universidade Federal de Viçosa em 2001, Mestre em Agroquímica pela Universidade Federal de Viçosa em 2003 e Doutor em Ciências, com área de concentração em Química, pela Universidade Estadual de Campinas em 2006. Realizou pós-doutoramento em Química Analítica no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas no período de 2007-2008. Professor do magistério superior da Universidade Federal de Uberlândia, campus Pontal, estando atualmente como Professor Associado IV. Atuando no ensino, ministra disciplinas da área de Química Analítica nos cursos de graduação em Química, Física, Biologia e Engenharia de Produção da UFU e nos Programas de pós-graduação em Química e em Biocombustíveis da UFU.

<http://lattes.cnpq.br/5710906021234699>



Antonio Carlos Ferreira Batista

Técnico em química Industrial pela UNAERP, graduação em Bacharelado em Química pela Universidade de São Paulo, graduação em Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológica pela Universidade de São Paulo, graduação em Licenciatura em Química pela Universidade de São Paulo, mestrado e doutorado em Química pela Universidade de São Paulo . Atualmente é Professor Associado do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal - Campus Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

<http://lattes.cnpq.br/6037406255124458>

<https://orcid.org/0000-0001-6313-4565>

7. Declaração de direitos

Os autores declaram ser detentores dos direitos autorais da presente obra, que o artigo não foi publicado anteriormente e que não está sendo considerado por outra(o) Revista/Journal. Declaram que as imagens e textos publicados são de responsabilidade dos autores, e não possuem direitos autorais reservados à terceiros. Textos e/ou imagens de terceiros são devidamente citados ou devidamente autorizados com concessão de direitos para publicação quando necessário. Declaram respeitar os direitos de terceiros e de Instituições públicas e privadas. Declaram não cometer plágio ou auto plágio e não ter considerado/gerado conteúdos falsos e que a obra é original e de responsabilidade dos autores.

8. Referências

1. GUERRA; Witter Duarte, OLIVEIRA; Flávia Costa, CHIESA; Jaqueline Elise Garcia, ALBUQUERQUE; Karolinne Gomes, MARTINS; Alexandre de Matos, DA ROCHA; Lucas Matheus, BATISTA; Antônio Carlos Ferreira. Revisão sistemática sobre o emprego e cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. na produção de biodiesel. Revista Sociedade Científica, vol.7, n.1, p.942-979. <https://doi.org/10.61411/rsc202426717> (2024).
2. Demirbas, Ayhan; Demirbas, M. Fatih. Importance of algae oil as a source of biodiesel. Energy conversion and management. v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.



3. Azeredo, V.B.S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. (2012).
4. Kohlhepp, Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. 2010. Estudos avançados. Cátedra de Geografia econômica e social da universidade de tübingen, Alemanha. (2010).
5. Shi, R.; Handler, R. M.; Shonnard, D. R. Life cycle assessment of novel technologies for algae harvesting and oil extraction in the renewable diesel pathway. *Algal Research*, v. 37, n. November 2018, p. 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.005>. (2019).
6. Silva, N.L.C.; Betancur, G.J.V.; Vasquez, M.P.; Gomes, E.B.; Pereira Jr. Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.163, p. 928-936. (2011).
7. Ramirez, Nelzy Neyza Vargas. Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de PósGraduação em Engenharia Química. (2013).
8. Guerra, W. D., Oliveira, F. C., Chiesa, J. E. G., Dias, I. S., Vieira, A. T., Borges, W. S., Costa, A. S. V., Faria, A. M., & Batista, A. C. F. Avaliação do rendimento de biomassa e lipídeos empregando diferentes regimes de cultivo em *Scenedesmus* sp. *Research, Society and Development*. 11(1), e18411124565 <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24565>. (2019).
9. Borges, W. S; Araújo, B. S. A; Moura, L. G; Morais Júnior, W. G, Resende, M. M; Cardoso, V. L. Comportamento de microalgas *Scenedesmus* sp., *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella* sp em relação ao teor de lipídeos



- e biomassa. São Paulo. Disponível em:
file:///C:/Users/witte/Downloads/Bioenergi1%20Wesley.pdf>. Acesso: 02 ago.
2017. (2013).
10. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. A simple. *The Journal of Biological Chemistry*, p. 497–509. <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v2i1.58>. (1956).
 11. Neto; Scarminio; Bruns. *Como Fazer Experimentos - 4.ed.: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na indústria*. (2010).
 13. RUANGSOMBOOM, S. Effect of light, nutriente, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga *Botryococcus braunii* KMITL2. *Bioresource Technology*, v. 109, p. 261-265. (2012).
 14. SINGH BIRENDRA P, VIRMANI, N., BHARGAVA, O.N., KISHORE N. AND GILL A. Yuehsienzella (Cambrian Series 2) trilobite from the Parahio Valley, Spiti region (Zanskar-Spiti Sub-Basin), India and its biostratigraphic significance. *Journal of the Palaeontological Society of India*, 59(1): 81-88. (2014).
 15. SILVA, N.L.C.; BETANCUR, G.J.V.; VASQUEZ, M.P.; GOMES, E.B.; PEREIRA JR. Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.163, p. 928-936. (2011).
 16. Chaichalerm, S.; Pokethitiyook, P.; Yuan, W.; Meetam, M.; Sritong, K.; Pugkaew, W.; Kungvansaichon L. K.; Kruatracheu, M.; Damrongphol, P. Culture of microalgal strain isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*, v. 89, p. 296-302. (2012).



17. TREVISAN, E.; BRANCO, K. B. Z. F. & ARROYO, P. A. Avaliação termogravimétrica da biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes condições nutricionais. *Engevista*, 21 (2), 242-255. (2019).
18. PRABAKARAN, P.; RAVIDRAN, A.D. A Comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in applied microbiology*, v. 53. P. 150-154. (2011).
19. HAKALIN, N, L, S; Otimização das condições de cultivo da microalga *scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel; Instituto de Ciências Biológicas Universidade de Brasília. (2014).
20. SATI, H., MITRA, M., MISHRA, S., BAREDAR, P. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. *Algal Research*, v. 38, n. January, p. 101413. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101413>. (2019).