

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**MICROALGA *SCENEDESMUS* SP.: PRODUÇÃO, APLICAÇÃO E ANÁLISE
DE COMPOSTOS DE INTERESSE A PARTIR DA PIRÓLISE RÁPIDA**

TESE DE DOUTORADO

Nelzy Neyza Vargas Ramirez de Bazan

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**MICROALGA *SCENEDESMUS* SP.: PRODUÇÃO, APLICAÇÃO E
ANÁLISE DE COMPOSTOS DE INTERESSE A PARTIR DA PIRÓLISE
RÁPIDA**

Nelzy Neyza Vargas Ramirez de Bazan

Tese de Doutorado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Engenharia

Área de concentração:

Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Orientadores:

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de doutorado *Microalga Scenedesmus sp.: produção, aplicação e análise de compostos de interesse a partir da pirólise rápida*, elaborada por *Nelzy Neyza Vargas Ramirez de Bazan*, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Fernanda Cabral Borges – FURG

Profa. Dra. Mariliz Gutterres Soares – PPGEQ /UFRGS

Dr. Fabio Felipe Gabriel Roselet – FURG

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho dentro de suas instalações e no programa de doutorado.

À CAPES, pela bolsa de doutorado e o apoio econômico.

À empresa COOPERCANA por fornecer a vinhaça usada neste trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler e Prof. Dr. Marcelo Farenzena, pela orientação, dedicação e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da comissão Examinadora, Prof. Dr. Fabio Felipe Gabriel Roselet, Profa. Dra. Fernanda Cabral Borges, Profa. Dra. Mariliz Gutterres Soares, pelas sugestões.

Aos coautores dos artigos científicos desenvolvidos neste trabalho, Lucas Ranzan, Amanda Pérez Klein, Lúcio Sulzbach Silva, Lucas Raymundo.

Minha mãe Celia Ramirez, meu esposo Ruddy Bazan e meu cunhado Ronny Bazan, pelo amor, compreensão e apoio que sempre me deram.

Aos amigos do DEQUI, Cristiane, Yolice, Juliano, Bruno, Bruna, Patricio, pela parceria e amizade.

Emfim, todos os que formaram parte desta experiência, muito obrigada.

Resumo

Além dos problemas de poluição causados pelo uso generalizado de combustíveis fósseis, a alta demanda energética no setor industrial e doméstico tornam cada vez mais necessário o desenvolvimento de fontes de energia renováveis com menor impacto ambiental do que as tradicionais e com elevada produtividade. Uma alternativa aos combustíveis fósseis é o uso de óleo de microalgas. A obtenção de produtos a partir desse óleo requer a análise de tecnológicas vantajosas em cada etapa da cadeia de produção. A presente pesquisa analisa alternativas tecnológicas para a obtenção de compostos de interesse científico a partir do cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. O estudo foi conduzido em 4 etapas: i) seleção de fotobiorreator (comparando o uso de sacos plásticos como fotobiorreator de baixo custo vs fotobiorreator *air-lift* de acrílico), ii) monitoramento do conteúdo de lipídios durante o cultivo (proposta de método de uso de espectroscopia de fluorescência vs método tradicional) para controle automático dos cultivos, iii) comparação de alternativas de colheita da biomassa produzida, e iv) a análise dos subprodutos existentes no bio-óleo gerado por pirólise rápida, visando a obtenção de produtos de alto valor agregado. Na primeira etapa, foram utilizados sacos plásticos para o cultivo de *Scenedesmus* sp. resultando em produtividade de $0,53 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, enquanto o fotobiorreator *air-lift* apresentou resultados de $0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Essa diferença de valores levou a considerar o efeito da radiação UV, barrada no *air-lift* enquanto os sacos permitem passar. Os experimentos nos sacos plásticos foram conduzidos com e sem filtros UV. Cultivos em sacos plásticos sem filtro UV apresentaram valores maiores do que aqueles com filtros UV, em termos de concentração máxima média (22% maior) e produtividade (24% maior). Concluiu-se que a passagem de luz UV é responsável pela diferença no crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. no fotobiorreator de baixo custo avaliado. A segunda etapa objetivou a quantificação de lipídios ao longo do cultivo: utilizando metodologia que combina o uso de corante Vermelho do Nilo, medidas de fluorescência e a metodologia Modelagem Quimiométrica com Componentes Espectrais Puros (PSCM). O ajuste dos resultados apresentou erro absoluto médio menor que 5% e R^2 de aproximadamente 0,99. Comprova-se que a metodologia de quantificação proposta neste projeto é mais eficiente que o método gravimétrico tradicional, exigindo menos de 30 minutos quando os métodos tradicionais podem levar até 5 horas. Na terceira etapa, avaliou-se o método de colheita das microalgas e suas melhores condições utilizando vinhaça como parte do meio de cultivo. Os métodos de sedimentação e flotação de ar dissolvido (FAD) foram comparados. Foram desenvolvidos planejamentos experimentais que avaliaram: pH, concentração de flocculante e velocidade de agitação, em meios de cultivo contendo 0%, 20% e 40% de vinhaça, tanto para sedimentação como para flotação. Ambos métodos de separação apresentaram valores de eficiência acima de 85%. O pH foi uma variável que influenciou significativamente em todos os casos, sendo que o ideal seria trabalhar com pH 6,7, mas quando o meio contém 40% de vinhaça o pH deve ser ácido na sedimentação. Na última etapa, a pirólise rápida foi utilizada como alternativa para obtenção de bio-óleo. A biomassa de microalga foi pirolisada a 600°C , gerando bio-óleo, biochar e gás. O bio-óleo foi avaliado devido ao interesse na obtenção de produtos químicos de valor agregado. O rendimento do bio-óleo é de cerca de 20%, caracterizado pela presença de compostos nitrogenados (17,59%), oxigenados (19,76%) e hidrocarbonetos (14,13%) que podem ser separados para aplicação industrial.

Palavras-chave: vinhaça, microalga, *Scenedesmus* sp., fotobiorreator, biorremediação.

Abstract

In addition to the pollution problems caused by the widespread use of fossil fuels, the high energy demand in the industrial and domestic sectors makes it increasingly necessary to develop renewable energy sources with less environmental impact than traditional ones and with high productivity. A possible alternative to fossil fuel is the use of microalgae oil. This research analyzes technological alternatives for obtaining compounds of scientific interest from the cultivation of the microalgae *Scenedesmus* sp. The study was conducted in four stages: i) selection of photobioreactor (comparing the use of plastic bags as a low-cost photobioreactor vs. acrylic air-lift photobioreactor), ii) monitoring of lipid content during cultivation (proposing a method with fluorescence spectroscopy vs. traditional method) for automatic control of crops, iii) comparison of alternative methods for harvesting the produced biomass, and iv) analysis of existing by-products in the bio-oil generated by fast pyrolysis, aiming to obtain products with high added value. In the first stage, using plastic bags to cultivate *Scenedesmus* sp., a productivity of $0.53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ was reached, while the air-lift photobioreactor presented results of $0.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$. This difference in values led to considering the effect of UV radiation, barred in the air-lift, while the bags allow it to pass. The experiments in plastic bags were conducted with and without UV filters. Cultures in plastic bags without UV filters showed higher values than those with UV filters, in terms of average maximum concentration (22% higher) and productivity (24% higher). It was concluded that the passage of UV light was responsible for the difference in the growth of the microalgae *Scenedesmus* sp. in the evaluated low-cost photobioreactor. The second stage aimed to quantify lipids throughout the culture using a methodology that combines Nile red dye, fluorescence measurements, and the PSCM methodology (Pure Spectral Chemometric Modeling). The adjustment of the results presented an average absolute error of less than 5% and an R^2 of approximately 0.99. This proves that the quantification methodology proposed in this project is more efficient in terms of time than the traditional gravimetric method, requiring less than 30 minutes when traditional methods can take up to 5 hours. In the third stage, the microalgae harvest method and its best conditions were evaluated using vinasse as part of the cultivation medium. Sedimentation and dissolved air flotation (FAD) methods were compared. Experimental designs were developed that evaluated the following variables: pH, flocculant concentration, and agitation speed, in culture media containing 0%, 20%, and 40% vinasse, for both sedimentation and flotation. The harvest efficiency results showed that both sedimentation and dissolved air flotation (FAD) can be used, and both separation methods showed efficiency with values above 85%. The pH was a variable that significantly influenced all cases, and the ideal would be to work with pH 6.7; however, when the medium contains 40% vinasse, the pH must be acidic in the sedimentation. In the last stage, fast pyrolysis was used as an alternative to obtain bio-oil. The microalgae biomass was pyrolyzed at 600°C , producing bio-oil, biochar, and gas. The bio-oil was evaluated for its potential in obtaining high-value-added chemical products. The bio-oil yield was about 20%, characterized by the presence of nitrogenous (17.59%), oxygenated (19.76%), and hydrocarbon (14.13%) compounds that can be separated for industrial application.

Keywords: vinasse, microalgae, Scenedesmus sp., photobioreactor, bioremediation.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivos.....	5
1.3 Estrutura do trabalho.....	5
1.4 Contribuições.....	5
1.5 Resumo gráfico.....	6
Capítulo 2 - Revisão bibliográfica.....	7
2.1 Microalgas.....	7
2.1.1 Uso das microalgas.....	8
2.1.2 Composição bioquímica das microalgas.....	9
2.1.2.1 Proteínas.....	10
2.1.2.2 Carboidratos.....	10
2.1.2.3 Lipídios.....	10
2.1.2.4 Pigmentos.....	11
2.1.3 Scenedesmus sp.....	11
2.1.3.1 Usos da Scenedesmus sp.....	12
2.1.4 Medidas de crescimento de microalgas.....	14
2.1.4.1 Contagem direta por microscopia.....	14
2.1.4.2 Densidade óptica.....	14
2.1.4.3 Peso seco.....	15
2.2 Fatores que influem no crescimento de microalgas.....	15
2.2.1 Intensidade luminosa.....	15
2.2.2 Temperatura.....	16
2.2.3 Nutrientes.....	17
2.3 Tipos de reatores para cultivo.....	17
2.3.1 Sistemas abertos.....	17
2.3.2 Sistemas fechados.....	18
2.4 Biorremediação com microalgas.....	19
2.5 Vinhaça.....	20
2.5.1 Processo de produção de etanol.....	20
2.5.2 Composição da vinhaça.....	22
2.5.3 Disposição final da vinhaça.....	23
2.6 Colheita de biomassa.....	24
2.6.1 Centrifugação.....	25
2.6.2. Flotação.....	25
2.6.3 Sedimentação.....	26
2.7 Quantificação de lipídios de microalgas.....	26
2.7.3 Espectroscopia de fluorescência.....	27

2.8 Pirólise rápida de microalga.....	29
2.8.1 Biochar.....	31
2.8.2 Bio-óleo.....	32
2.8.3 Gás.....	32
Capítulo 3 - Microalgae cultivation using plastic bags as photobioreactor and analysis of UV radiation effects.....	35
3.1 Introduction.....	35
3.2 Materials and methods.....	36
3.2.1 Microalgae and culture medium.....	36
3.2.2 Properties of air-lift photobioreactor (plexiglass) and low-cost photobioreactor (plastic bags).....	37
3.2.3 Experimental System and material properties.....	38
3.2.4 Determination of microalgae concentration.....	38
3.2.5 Use of UV filter in low-cost photobioreactors (plastic bags).....	39
3.2.6 Analysis of the UV filters.....	40
3.2.7 UV effect in the growth of microalgae.....	40
3.3 Results and discussion.....	41
3.3.1 Photobioreactor selection for <i>Scenedesmus</i> sp. culture.....	41
3.3.2 Comparison of microalgae growth using UV filters.....	42
3.4 Conclusions.....	44
Capítulo 4 - Comparison of dissolved air flotation and sedimentation for harvesting of <i>Scenedesmus</i> sp cultivated in ethanol vinasse.....	45
4.1 Introduction.....	46
4.2 Materials and methods.....	47
4.2.1 Culture medium.....	47
4.2.2 Photobioreactors system.....	47
4.2.3 Biomass concentration measurement.....	47
4.2.4 Microalgae growth in vinasse.....	48
4.2.5 Flocculation process.....	48
4.2.6 Dissolved air flotation process.....	49
4.2.7 Sedimentation process.....	49
4.2.8 Experimental designs.....	50
4.3 Results and discussion.....	50
4.3.1 Central Composite Design 1 (CCD1): Without vinasse.....	50
4.3.2 Central Composite Design 2 (CCD2): Experiments with 20% vinasse.....	52
4.3.3 Central Composite Design 3 (CCD3): Experiments containing 40% vinasse...	54
4.4 Conclusions.....	55
Capítulo 5 - Rapid quantification of lipids in microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. using fluorescence.....	57
5.1 Introduction.....	57
5.2 Materials and Methods.....	59
5.2.1 Microalgae strain and culture conditions.....	59

5.2.2 Biomass measurement.....	60
5.2.3 Sample pretreatment for lipid measurement.....	60
5.2.4 Photobioreactors used for lipid determination.....	60
5.2.5 Lipid quantification.....	61
5.2.6 Lipid determination: Gravimetric method.....	61
5.2.7 Lipids determination: Fluorescence.....	61
5.3 Results.....	64
5.3.1 Microalgae growth curve.....	64
5.3.2 Lipid Content: Gravimetric Method.....	64
5.4 Discussion.....	66
5.5 Conclusion.....	67
Capítulo 6 - Characterization of bio-oil obtained from fast pyrolysis of <i>Scenedesmus</i> sp.....	69
6.1 Introduction.....	69
6.2 Materials and Methods.....	70
6.2.1 Microalgae cultivation conditions.....	70
6.2.2 Biomass measurement.....	71
6.2.3 Biomass preparation for fast pyrolysis.....	71
6.2.4 Fast pyrolysis conversion.....	71
6.2.5 Bio-oil characterization: Chromatographic analysis.....	72
6.3 Results and discussion.....	73
6.3.1 <i>Scenedesmus</i> sp. growth curve.....	73
6.3.2 Products obtained from microalgae pyrolysis.....	73
6.3.3 Compounds identified in bio-oil.....	74
6.4 Conclusion.....	82
Capítulo 7 - Considerações finais.....	83
7.1 Conclusões.....	83
7.2 Trabalhos futuros.....	84
Referências.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Documentos por ano relacionados a pesquisa de produção de microalgas dados entre 2000 e 2022 (Fonte: SCOPUS, 2022).....	2
Figura 1.2. Número de pesquisas por país entre 2000 e 2022 (Fonte: SCOPUS, 2022).....	2
Figura 2.1. Sistemas abertos adaptados ao cultivo de algas: a) lagoa raceway, b) lagoas circulares. Adaptado de Chisti (2007) e Sirajunnisa et al. (2016).....	17
Figura 2.2 Fotobioreatores fechados: a) Tanque agitado; b) Esquema de coluna de bolhas; c) Esquema de tubular horizontal; d) Esquema de painel plano; e) Saco plástico; f) Air-lift plano. Adaptado de Benner et al. (2022), Gris et al. (2013), Gupta et al. (2015) e Huang et al. (2017).....	18
Figura 2.3. Processos de produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas: componentes, entradas e saídas. Adaptado de Wilkie et al. (2000).....	21
Figura 2.4. Dados de produção de etanol na safra de 2019/2020 (ANP, 2021).....	22
Figura 2.5. Fertirrigação com vinhaça: a) Usina Açucareira Guaíra Ltda., b) Método utilizado (Fonte FINEP, 2021).....	23
Figura 2.6. Postulado de vias químicas de componentes de microalgas na pirólise. Adaptado de Yang et al. (2019).....	30
Figura 2.7 Rendimento de produtos da pirólise de microalgas em diferentes temperaturas. Adaptado de Mustapha et al. (2023).....	31
Figura 2.8. Aplicações de gás produzido por pirólise (DE MORAIS et al., 2023).....	33
Figure 3.1. The absorption spectrum of the photobioreactors: (a) in the UV, (b) in the visible.....	37
Figure 3.2. Cultivation system of <i>Scenedesmus</i> sp. in (a) air-lift photobioreactor (plexiglass) (b) low-cost photobioreactors (plastic bag).....	38
Figure 3.3. Absorption values of the UV filters for the wavelength at (a) UV radiation spectrum 200 nm to 340 nm, (b) UV radiation spectrum 340 nm to 400 nm, (c) visible spectrum: 400 nm to 800 nm.....	40
Figure 3.4. Biomass logarithmic growth curve in air-lift photobioreactor and low-cost photobioreactors (Error bars have been suppressed due to low error in the data).....	41
Figure 3.5. The logarithmic curve of biomass growth PB1-UVF and PB1+UVF.....	43
Figure 4.1. Photobioreactor dimensions and aeration system layout.....	47
Figure 4.2. Biomass logarithmic growth curve in culture medium with 0%, 20% or 40% vinasse content.....	48
Figure 4.3. (a) Jar test equipment laboratory (model Milan JTC), (b) Schematic representation of DAF system.....	49
Figure 4.4. CCD 1 (0% vinasse) for DAF: Response surface for <i>Scenedesmus</i> sp. harvesting efficiency - CCD1 for DAF (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH-flocculant concentration - harvesting efficiency.....	51
Figure 4.5. CCD1 (0% vinasse) for sedimentation: Response surface for <i>Scenedesmus</i> sp. harvesting efficiency - CCD1 for DAF (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency.....	52
Figure 4.6. CCD2 (20% vinasse) for DAF: Response surface for <i>Scenedesmus</i> sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH- flocculant concentration - harvesting efficiency.....	53

Figure 4.7. CCD2 (20% vinasse) for sedimentation: Response surface for <i>Scenedesmus</i> sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency.....	53
Figure 4.8. CCD3 (40% vinasse) for DAF: Response surface for <i>Scenedesmus</i> sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency.....	54
Figure 4.9. CCD3 (40% vinasse) for sedimentation: Response surface for <i>Scenedesmus</i> sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency.....	55
Figure 5.1. Microalgae drying curve in an oven at 40°C for 9h.....	60
Figure 5.2. Schematic ACO algorithm. Extracted from Ranzan et al. (2015).....	62
Figure 5.3. Mean fluorescence spectra of all microalgae samples.....	64
Figure 5.4. Growth logarithmic curve microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. in air-lift photobioreactors under conditions of 20°C and 10,000 lux.....	64
Figure 5.5. Biomass and lipid content of microalgae <i>Scenedesmus</i> sp. (a) comparison between biomass concentration and lipid concentration, (b) comparison between biomass concentration and lipid content.....	65
Figure 5.6. All the selected pairs for (a) the whole spectra models and (b) the AGF models.....	66
Figure 6.1. Photobioreactor dimensions and aeration system layout for biomass cultivation.....	71
Figure 6.2. Process diagram of laboratory-scale pyrolysis system: 1. Feeder, 2. fluidized-bed reactor, 3. Heat gun, 4. Cyclone, 5. Biochar collector, 6. Condenser with online separation column, 7. Bio-oil collector, 8. Electrostatic precipitator.....	72
Figure 6.3. Biomass logarithmic growth curve of <i>Scenedesmus</i> sp.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Empresas que utilizam microalgas para obtenção de subprodutos (Adaptado de Ahmad e Ashraf, 2023).....	8
Tabela 2.2. Principais usos das microalgas (Adaptado de García, Vicente e Galán, 2017)...	9
Tabela 2.3. Classificação da <i>Scenedesmus</i> sp (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016; XU et al., 2019).....	11
Tabela 2.4. Composição química de fontes de alimentos humanos e diferentes <i>Scenedesmus</i> (BECKER, 2013; ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016).....	12
Tabela 2.5. Composição de ácidos graxos da cepa de microalgas <i>Scenedesmus</i> (KUMAR; BANERJEE; JAGADEVAN, 2021).....	13
Tabela 2.6. Metabólitos encontrados de <i>Scenedesmus</i> sp. (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016).....	13
Tabela 2.7. Caracterização composicional dos diferentes tipos de vinhaça (SANTOS et al., 2019a).....	22
Tabela 2.8. Métodos de colheita de microalgas (HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK, 2021).....	24
Tabela 2.9. Eficiência de separação de biomassa de microalga usando: Flotação com microesferas, Flotação por ar disperso, ou Flotação por ar dissolvido (HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK, 2021).....	25
Tabela 2.10. Resumo das técnicas de quantificação lipídica em microalgas. Adaptado de Hounslow et al. (2017).....	27
Tabela 2.11. Pares de comprimento de onda de excitação/emissão utilizados na determinação de lipídios de microalgas usando espectroscopia de fluorescência e corante vermelho do Nilo (REN et al., 2015).....	29
Tabela 2.12. Abundância relativa de grupos de compostos presentes no bio-óleo de pirólise rápida de microalgas em diferentes temperaturas.....	32
Table 3.1. Properties of low-cost photobioreactors (plastic bags).....	37
Table 3.2. Features and specifications of UV filters.....	39
Table 3.3. Maximum concentration and productivity for each photobioreactor.....	41
Table 3.4. Maximum average concentration and average productivity of experiment with and without UV filter.....	43
Table 4.1. Values defined by CCD for <i>Scenedesmus</i> sp cultivated in Guillard Modified Medium without vinasse, medium with 20% in vinasse and medium with 40% in vinasse.....	50
Table 5.1. Excitation/Emission wavelengths used in different microalgae lipid determination using Nile Red.....	58
Table 5.2. Guillard Modified culture medium.....	59
Table 5.3. Metrics for the best predictive model of each size and the selected Ex/Em pairs.....	65
Table 6.1. Comparison of major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from fast pyrolysis of <i>Scenedesmus</i> sp.....	74
Table 6.2. Major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from pyrolysis of <i>Scenedesmus</i> sp.....	75
Table 6.3. Distribution of product types generated in bio-oil from microalgae pyrolysis....	81

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Motivação

Muitas das atividades humanas utilizam energia que por muitos anos foi produzida a partir de combustíveis fósseis. Hoje em dia, a produção mundial de energia está voltada para a transição do uso de derivados de petróleo para biocombustíveis à base de biomassa, visando atender uma emergente economia sustentável que permite a redução de emissões de gases de efeito estufa. Neste ponto surge o conceito de biorrefinaria baseada em biomassa. Diferentes modelos de biorrefinaria estão nos estágios iniciais de desenvolvimento em diferentes partes do mundo. Para enfrentar os desafios globais ambiental e economicamente, a mudança de paradigma da produção de biocombustíveis para a biorrefinaria é inevitável.

Dependendo da matéria-prima, os biocombustíveis são divididos em diferentes gerações. Os biocombustíveis de terceira geração constituem biocombustíveis derivados de microalgas, que têm atraído a atenção da investigação nos últimos anos devido à sua elevada taxa de crescimento, elevado teor lipídico, capacidade de sobreviver em condições adversas e não competição por terras agrícolas, entre outros. As microalgas, durante seu crescimento, reduzem as emissões de CO₂ devido à mitigação biológica e no tratamento de efluentes. No entanto, são os fins energéticos que mais contribuem para o enorme desenvolvimento que as microalgas estão experimentando. Para que esses usos sejam economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis, é necessário reduzir significativamente os custos de produção e os impactos ambientais, alcançando um balanço favorável de energia e CO₂. Por isto, tem se realizado diversas pesquisas com foco na produção de microalgas desde 1970 até hoje. Observa-se na Figura 1.1 que a produção de microalgas chama a atenção de diversos autores nos últimos 15 anos (Palavras-chave usadas na base de dados SCOPUS: microalgae production).

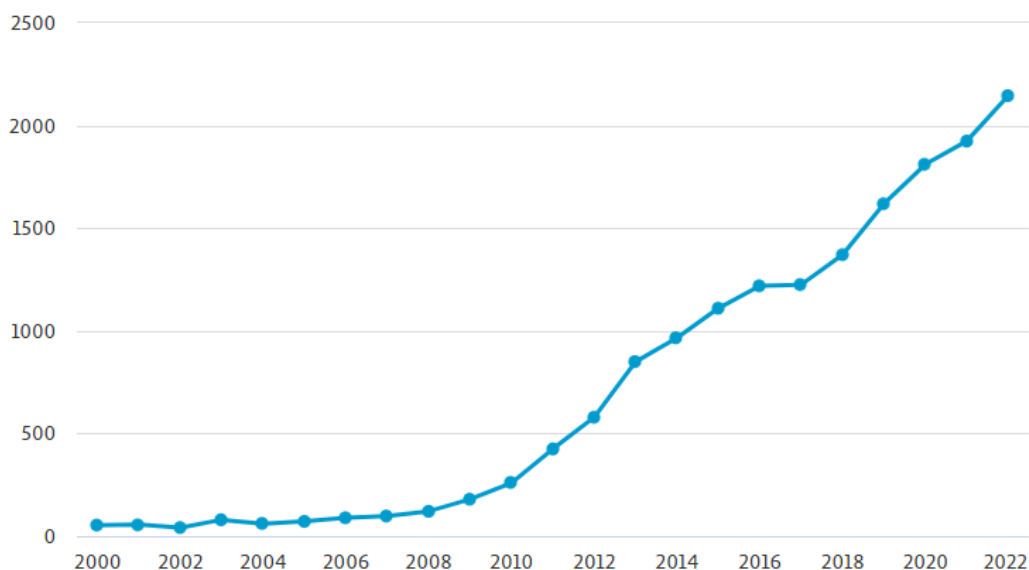


Figura 1.1. Documentos por ano relacionados a pesquisa de produção de microalgas dados entre 2000 e 2022 (Fonte: SCOPUS, 2022).

Muitos países têm demonstrado interesse na produção de microalgas. A Figura 1.2 mostra os países que conduziram extensas pesquisas e planejamento estratégico sobre bioenergia de microalgas, principalmente nas áreas de energia, ciências agrárias e meio ambiente. Sendo a China o país que mais tem pesquisado sobre produção de microalgas, ficando o Brasil em quinto lugar.

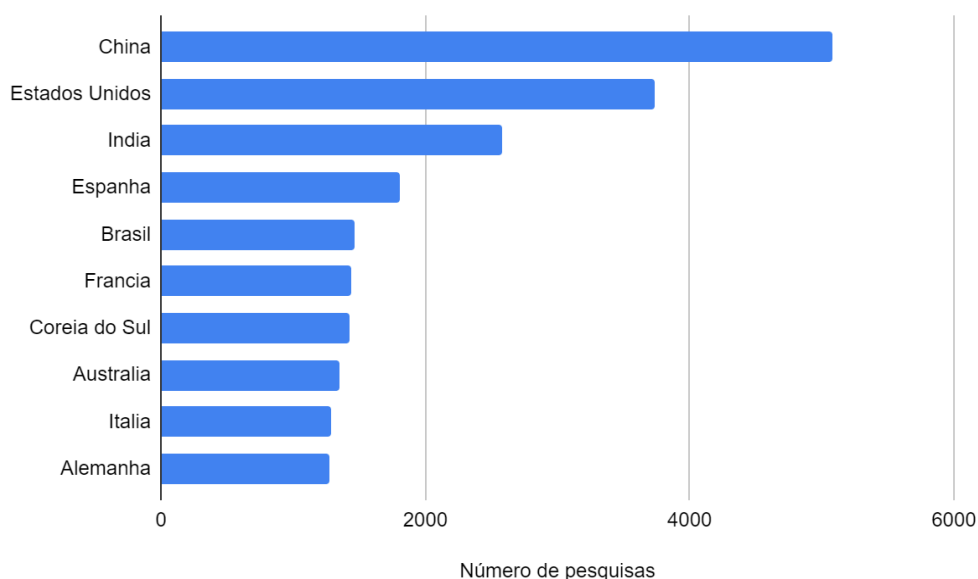


Figura 1.2. Número de pesquisas por país entre 2000 e 2022 (Fonte: SCOPUS, 2022).

Pesquisas com microalgas alcançaram enorme importância, principalmente pela combinação de usos que podem ter. Para fins energéticos, além da obtenção de biodiesel, podem ser produzidos outros biocombustíveis como bioetanol, biometano e biohidrogênio, além de geração de calor e eletricidade (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012). Outras aplicações comerciais das microalgas buscam a obtenção de produtos de alto valor agregado com aplicações em nutrição e saúde humana, aquicultura, cosméticos e biofertilizantes. Apesar do importante desenvolvimento dos

últimos anos, o tipo de microalga cultivada influencia nas condições de produção (PUGAZHENDHI et al., 2020).

A presente tese de doutorado utilizou como base para os experimentos com vinhaça o trabalho de mestrado, realizado no Departamento de Engenharia Química da UFRGS, intitulado: “Estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em vinhaça” da própria autoria. O estudo avaliou a viabilidade técnica de produção da microalga *Scenedesmus* sp. para tratamento de vinhaça de etanol. Verificou-se que a *Scenedesmus* sp. pode crescer em meio de cultivo contendo até 40% de vinhaça em sua composição. O efluente tratado apresentou redução de nitrogênio e fósforo de quase 100%. Além disso, foram avaliados métodos como espectrofotometria e espectroscopia de fluorescência, que se mostraram métodos adequados para acompanhamento do crescimento de microalgas em fotobiorreatores. No entanto, o método de determinação lipídica utilizando espectroscopia de fluorescência precisava de melhorias. A partir disso, o desenvolvimento de tecnologia para produção da *Scenedesmus* sp, envolve questões que precisam ser estudadas. Consequentemente, o presente trabalho analisa as etapas de produção da microalga *Scenedesmus* sp. e propõe alternativas que possam ser utilizadas em cada etapa do processo. A Figura 1.3 ilustra as etapas e suas necessidades, é preciso avaliar fatores como condições de cultivo desta microalga, meios de cultura alternativos (que podem envolver o reaproveitamento de efluentes industriais), tipos de fotobiorreatores que ofereçam melhor custo-benefício, métodos de separação que apresentem eficiência ótima, e a utilização de compostos gerados para fins industriais, entre outros.

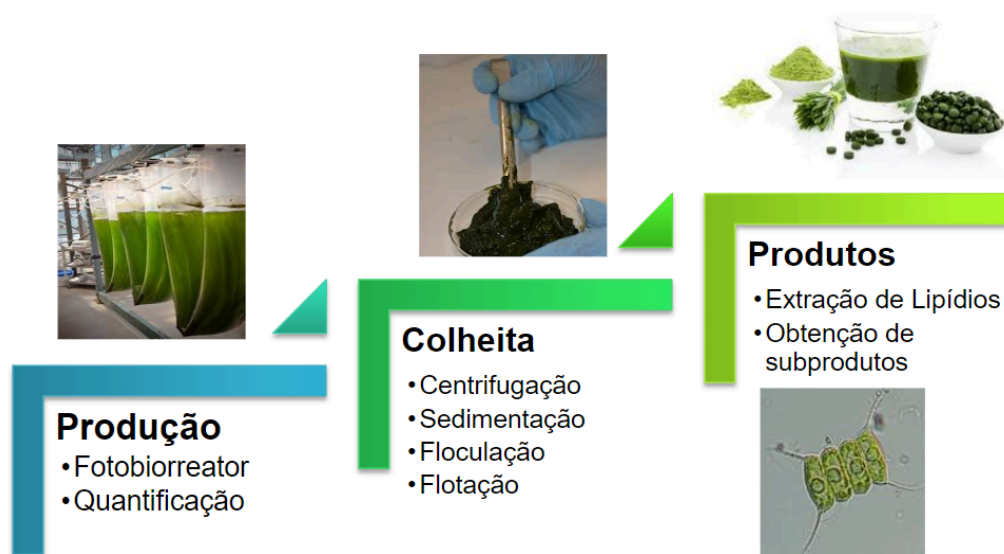


Figura 1.3. Etapas da produção da microalga *Scenedesmus* sp. e suas necessidades.

Ao considerar essas alternativas é possível otimizar o processo de produção de microalgas, tornando-o mais eficiente e sustentável. Por exemplo, ao caracterizar a microalga *Scenedesmus* sp., pode-se compreender as suas necessidades específicas e adaptar o meio de cultura em conformidade. Isto pode incluir a utilização de águas residuais industriais como fonte de nutrientes, o que não só reduz o desperdício, mas também contribui para a economia circular. Além disso, a seleção do tipo de fotobiorreator mais adequado é essencial.

Os fotobiorreatores desempenham um papel fundamental no cultivo de microalgas, proporcionando as condições ideais para o crescimento e desenvolvimento desses organismos. Eles oferecem um ambiente controlado, com níveis de luz, temperatura e nutrientes ajustáveis, permitindo um cultivo mais eficiente e produtivo. Um aspecto a ser estudado é o uso alternativo de fotobiorreatores de baixo custo nesse processo. É

necessário discutir as vantagens dos fotobiorreatores em relação a outros métodos de cultivo e os benefícios de utilizar sacos plásticos. A utilização de sacos plásticos no cultivo de microalgas é uma abordagem inovadora e promissora. Essa técnica possibilita uma maior flexibilidade e escalabilidade do cultivo, além de reduzir os custos associados. Os sacos plásticos oferecem uma superfície de crescimento ampla e são facilmente manejáveis, tornando-se uma opção viável para o cultivo comercial. Alguns desafios que devem ser avaliados é se existe a necessidade de controle rigoroso da qualidade dos sacos plásticos, manutenção da esterilidade e prevenção de contaminação e se é possível fazer o monitoramento constante das condições internas dos sacos (CHEN; YAO-HSIN; HUANG, 2021; THEIN et al., 2014; ZHU et al., 2017).

Outra etapa importante no processo de produção de microalgas é a colheita da biomassa, sendo necessário selecionar o método adequado para garantir a eficiência e o sucesso da produção, sendo alguns desses métodos a centrifugação, sedimentação, floculação, flotação ou a combinação entre eles (BUTLER et al., 2021; CAI et al., 2021; CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016). Cada um apresenta desafios que devem ser avaliados para escolher o método de colheita que se adeque à realidade do cultivo da microalga. Isto requer a análise dos fatores que influenciam essa escolha como a viabilidade técnica, custos, rendimento e a qualidade do produto final. Os desafios na escolha do método de colheita de microalgas são: complexidade das características das microalgas (diferentes espécies de microalgas possuem características únicas que podem influenciar a escolha do método de colheita adequado), necessidade de alta eficiência (a colheita de microalgas em escala comercial requer métodos eficientes que garantam altos rendimentos) e viabilidade (a escolha do método de colheita também deve levar em consideração os custos envolvidos, incluindo equipamentos e produtos químicos) (GERARDO et al., 2015; HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK, 2021; LEITE; DOS SANTOS; DANIEL, 2020).

O conteúdo de lipídios e carboidratos nas microalgas é uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis e outros produtos sustentáveis. Além do seu potencial como biocombustível, os lipídios também possuem valor nutricional, sendo ricos em ácidos graxos benéficos para a saúde humana. Os lipídios podem ser utilizados para a produção de medicamentos, como antioxidantes e compostos anti-inflamatórios. A produção de microalgas requer o acompanhamento do conteúdo de lipídios. A espectroscopia de fluorescência 2D surge como uma alternativa para quantificar o conteúdo de lipídios nas microalgas (GOVENDER et al., 2012; GUSBETH et al., 2016). Esta técnica auxilia no cultivo, permitindo a colheita das microalgas no momento ideal para a extração máxima de lipídios. Oferece vantagens como precisão, velocidade e não destrutividade, auxiliando no monitoramento e no cultivo das microalgas. A análise dos dados coletados pela espectroscopia de fluorescência 2D pode ajudar a determinar o momento exato de colheita das microalgas, quando o conteúdo de lipídios é máximo, maximizando a eficiência da extração, possibilitando o desenvolvimento de processos industriais mais eficientes, economizando tempo e recursos (RANZAN et al., 2022, p. 202; REN et al., 2015; WANG et al., 2019).

A pirólise rápida é uma alternativa para a obtenção de subprodutos das microalgas. Trata-se de uma técnica que utiliza altas temperaturas e ausência de oxigênio para produzir subprodutos como biochar, gás e bio-óleo. O biochar é excelente como adubo orgânico na agricultura, excelente fixador de carbono que melhora a qualidade do solo e diminui emissão de gases de efeito estufa. O gás obtido pela pirólise rápida de microalgas pode ser utilizado para geração de energia e para aquecimento (LI et al., 2022; SHEN; WU, 2023). O bio-óleo produzido é o subproduto mais interessante comercialmente. Trata-se de um produto de alta qualidade composto por hidrocarbonetos líquidos, ácidos carboxílicos, ésteres, fenóis e outros compostos, que podem ser utilizados em várias

aplicações industriais, desde a produção de combustíveis até a produção de produtos químicos (AYSU; SANNA, 2015; CAI; LIU, 2016; FONSECA et al., 2021; NYONI; HLANGOTHI; HLABANO-MOYO, 2022).

É necessário analisar e propor alternativas para cada etapa da produção de microalgas. Ao explorar estas alternativas, pode-se otimizar a eficiência do processo produtivo.

1.2 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho é a análise de alternativas tecnológicas para a obtenção de compostos de interesse científico-econômico a partir do cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. Para isto, os objetivos específicos pretendem viabilizar a produção de microalgas a través de:

- (O1) Redução de custo de produção: propondo utilização alternativa de fotobiorreator;
- (O2) Análise da eficiência de colheita: testando e analisando métodos de separação;
- (O3) Utilização na biorremediação: usar a vinhaça de etanol aproveitando o conteúdo de compostos úteis para serem utilizados no meio de cultivo;
- (O4) Caracterização dos lipídios: empregando método de acompanhamento alternativo ao convencional;
- (O5) Obtenção de subprodutos: através da pirólise rápida como alternativa.

1.3 Estrutura do trabalho

O presente documento está dividido em sete capítulos. No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica referente às características tanto das microalgas como da vinhaça como resíduo industrial que pode ser usado para cultivo das microalgas. Além disso, detalha as características de cada etapa do processo de produção de biomassa de microalga, desde o cultivo até os subprodutos gerados.

O Capítulo 3 explica a etapa de cultivo considerando o uso de fotobiorreatores de baixo custo (sacos plásticos) como alternativa para reduzir custos na produção. Os resultados deste estudo foram compilados no artigo “Microalgae cultivation using plastic bags as photobioreactor and analysis of UV radiation effects”.

O Capítulo 4 apresenta os métodos de flotação e sedimentação como alternativas de separação. Os resultados deste estudo foram compilados no artigo “Comparison of dissolved air flotation and sedimentation for harvesting of *Scenedesmus* sp cultivated in ethanol vinasse”.

No Capítulo 5 é descrita a metodologia empregada para determinação do conteúdo de lipídios nas microalgas, usa-se espectroscopia de fluorescência. Os resultados deste estudo foram compilados no artigo “Rapid quantification of lipids in microalgae *Scenedesmus* sp. using fluorescence”.

No Capítulo 6 considera-se o uso da pirólise rápida como método de obtenção de compostos com interesse comercial. Os resultados são descritos no artigo “Characterization of bio-oil obtained from fast pyrolysis of *Scenedesmus* sp”.

Finalmente, o Capítulo 7 apresenta as conclusões e algumas sugestões para trabalhos futuros.

1.4 Contribuições

Podem-se listar como principais contribuições desta tese os seguintes pontos:

(C1) Identificação das condições de cultivo em fotobiorreator de baixo custo para aplicação no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp.

(C2) Determinação das condições ótimas para a separação de biomassa microalgal utilizando flotação.

(C3) Determinação das condições ótimas para a separação de biomassa microalgal utilizando sedimentação.

(C4) Identificação de lipídios através do uso de espectroscopia de fluorescência 2D.

(C5) Caracterização de subprodutos do bio-óleo obtido por pirólise rápida da microalga *Scenedesmus* sp.

1.5 Resumo gráfico

Para uma melhor compreensão da estrutura do trabalho foi elaborado um resumo gráfico (Figura 1.4) que relaciona os objetivos e as contribuições resultantes. A partir deste resumo é possível ter uma visão geral de como este trabalho foi estruturado, bem como das interligações entre as diferentes etapas que levaram à conclusão do mesmo.

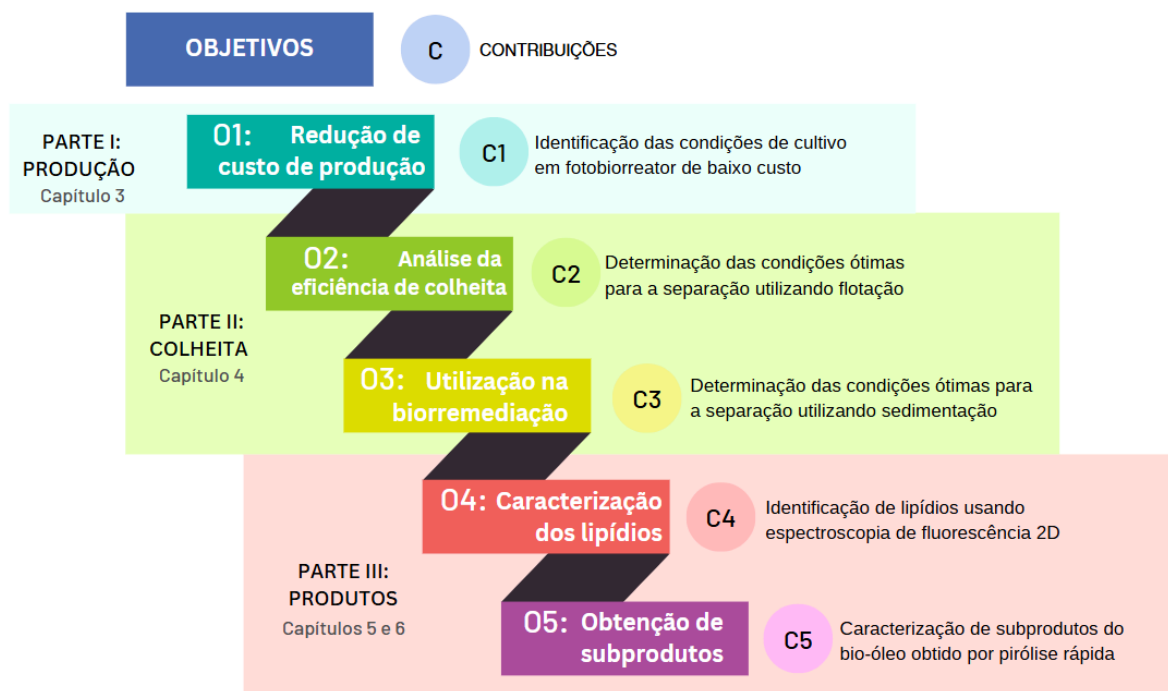


Figura 1.4. Resumo gráfico, indicando as conexões entre os objetivos, contribuições e capítulos deste trabalho.

Capítulo 2 - Revisão bibliográfica

Este capítulo descreve a importância da produção de microalgas, o uso das microalgas para biorremediação e as etapas necessárias para produção de biomassa em larga escala. Serão apresentadas tecnologias de produção de microalgas, que vão do cultivo, colheita, extração e processos de conversão de biocombustíveis.

2.1 Microalgas

As microalgas são um grupo muito diversificado de microrganismos fotossintéticos (capazes de converter energia solar em energia química) que podem ser encontradas em uma ampla variedade de habitats, desde água doce até oceanos, crescendo sob uma ampla faixa de valores de temperatura, salinidade, pH e intensidade de luz. Mais de 6.000 espécies foram identificadas nos oceanos, respondendo pela produção de 50% do oxigênio necessário para sustentar a vida na Terra. As microalgas também desempenham um papel ecológico central como produtores primários de biomassa, estabelecendo a base das cadeias alimentares aquáticas (CHAPMAN, 2013; PŁACZEK; PATYNA; WITCZAK, 2017). As microalgas crescem sob diferentes condições de cultivo e podem crescer de maneira autotrófica, heterotrófica ou mixotrófica (RUIZ et al., 2022). Geralmente é possível encontrar as microalgas nos corpos de água como lagoas, mares e rios, mas também podem estar presentes no solo, os quais fazem que elas sejam adaptáveis em várias condições. O sistema de cultivo pode ser construído em solo não arável, sendo possível instalar o sistema de cultivo em regiões desérticas; a produção da biomassa de microalga pode ser combinada com fixação direta de CO₂; ocorre o ano inteiro (não têm safra) (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016).

Nas últimas décadas, as microalgas também têm sido de grande interesse para a comunidade científica devido ao grande e crescente número de aplicações biotecnológicas que apresentam. Especificamente, elas têm sido descritas como uma fonte de alto rendimento de compostos de carbono e boas candidatas para a mitigação de emissões de CO₂. Seu cultivo em escala industrial para a produção de bioprodutos usados como bioestimulantes na agricultura, suplementos de saúde, produtos farmacêuticos e cosméticos também é amplamente explorado atualmente (MUTANDA et al., 2020).

As microalgas podem ser cultivadas para biofixar o CO₂ proveniente do gás de combustão de carvão e contribuir para redução do aquecimento global, visto que cada quilograma de biomassa de alga seca remove aproximadamente 1,83 kg de CO₂ (CHISTI, 2007). As microalgas têm a característica de bioissorção. Materiais de origem biológica como os bioissorventes possuem a capacidade de adsorver e/ou absorver íons metálicos dissolvidos, óleos e corantes. Entre esses materiais estão os micro-organismos (bactérias, microalgas e fungos) e vegetais macroscópicos (algas, gramíneas, plantas aquáticas (GUPTA; RASTOGI, 2008).

2.1.1 Uso das microalgas

As microalgas são adequadas para a absorção de CO₂ atmosférico, para a produção de biocombustíveis, para a purificação de águas residuais municipais e para a produção de biomoléculas. Microalgas de várias espécies já são produzidas a uma escala comercial em vários países e utilizadas para a produção de suplementos alimentares, alimentos para animais, pigmentos, ácidos graxos ω_3 , e a biomassa para aquicultura. As microalgas podem produzir eficientemente abundante biomassa (7 a 20 vezes maior que soja ou milho por unidade de terra) com alto teor de lipídios (EIDA; DARWESH; MATTER, 2018). Além de serem utilizadas como suplementos nutricionais, têm certos efeitos terapêuticos, como redução do colesterol, propriedades anticancerígenas, papel neuroprotetor e aprimoramento do sistema imunológico (WONG et al., 2022). Ahmad e Ashraf (2023) apresentam uma compilação de produtos à base de microalgas disponíveis no mercado, indicando os nomes das empresas, espécies de microalgas, sistemas de cultivo, produtos e links para seus respectivos sites (algumas empresas são citadas na Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Empresas que utilizam microalgas para obtenção de subprodutos (Adaptado de Ahmad e Ashraf, 2023)

Empresa	País	Microalga	Produto
Cellana, LLC	Estados Unidos	<i>Staurosira</i> sp.	Óleos ricos em ômega-3
TerraVia Holdings, Inc. (anteriormente Solazyme)	Estados Unidos	<i>Chlorella</i> sp.	Produtos diversos à base de microalgas, usado como ingrediente alimentar, óleos alimentares e para fins de aquicultura.
AlgaEnergy	Espanha	<i>Arthrospira</i> sp. (<i>Spirulina</i>)	Bioestimulantes agrícolas, ração para aquicultura e suplementos alimentares
Taau Australia Pty Ltda.	Australia	<i>Arthrospira</i> sp. (<i>Spirulina</i>)	Consumo humano na forma de tablets e em pó
AZBIO	Estados Unidos	Microalga marinha	Omega-3
AllMicroalgae	Portugal	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i>	Alimentos e rações em pó e pasta

Tabela 2.1 Empresas que utilizam microalgas para obtenção de subprodutos (Adaptado de Ahmad e Ashraf, 2023) (Continuação)

Empresa	País	Microalga	Produto
Blue Biotech International GmbH	Alemanha	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Haematococcus</i>	Algas concentradas, pasta congelada, células liofilizadas, ficocianina, astaxantina e microalgas em pó
TOLO Green SRL	Italia	<i>Arthrospira</i> sp. (<i>Spirulina</i>)	Suplementos alimentares e bioestimulantes
Microphyt	França	<i>Arthrospira</i> sp. (<i>spirulina</i>), <i>Haematococcus pluvialis</i>	Suplementos alimentares em pó e pasta
Hangzhou OuQi Food Co., Ltd.	China	<i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella salina</i>	<i>Spirulina</i> orgânica, <i>Chlorella</i> orgânica, <i>Chlorella</i> quebrada, <i>Dunaliella</i> orgânica

As microalgas são matérias-primas promissoras para alimentos, rações, combustível, fertilizantes, produtos químicos finos e outros produtos de valor agregado, sendo consideradas de grande potencial no tratamento de águas residuais (EIDA; DARWESH; MATTER, 2018; GARCÍA; VICENTE; GALÁN, 2017; WANG et al., 2018). A Tabela 2.2 apresenta os principais usos das microalgas.

Tabela 2.2. Principais usos das microalgas (Adaptado de García, Vicente e Galán, 2017).

Uso	Microalga
Obtenção de vitaminas e carotenóides	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i>
Obtenção de PUFA (polyunsaturated fatty acids)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Monodus subterraneus</i> , <i>P. cruentum</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Schizochytrium</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Murellopsis</i> sp., <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus almeriensis</i> , <i>Auxenochlorella protothecoides</i>
Obtenção de polissacarídeos	<i>Porphyridium</i> spp
Obtenção de suplementos alimentares	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Odontella aurata</i> , <i>Tetraselmis chuii</i> , <i>Aphanizomenon flosaquae</i> , <i>Nostoc</i> , <i>A. sacrum</i> , <i>Spirogyra</i> , <i>Oedogonium</i>

2.1.2 Composição bioquímica das microalgas

A composição bioquímica das microalgas é muito variável entre espécies e também na mesma espécie devido a mudanças em fatores tais como nutrientes, temperatura,

fotoperíodo, salinidade, fonte de carbono, intensidade de luz. Basicamente são compostas de proteínas, carboidratos, lipídios e outros compostos não classificados (GALARZA, 2019). As biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos são constituintes comuns em microalgas (RAJKUMAR; YAAKOB; TAKRIFF, 2013).

2.1.2.1 Proteínas

Vários tipos de microalgas são fonte valiosa de proteína que compete favoravelmente em quantidade e qualidade com produtos tradicionais como ovos, soja ou peixe. Além disso, eles conseguem sintetizar todos os 20 aminoácidos e ser uma fonte rara de aminoácidos essenciais (GALARZA, 2019).

A produção de proteínas depende das necessidades da espécie em particular, afetada segundo a quantidade de nitrogênio no meio de cultivo, devido à relação nitrogênio:fósforo (N:P). O conteúdo de proteínas das microalgas diminui proporcionalmente com o incremento da idade do cultivo. Outros fatores que influenciam um maior teor de proteína celular são o aumento na irradiação de luz durante um longo fotoperíodo, as características estruturais, a composição química e a morfologia da microalga. Várias espécies de microalgas foram identificadas como produtoras de altos teores de proteína. Por exemplo, a *Spirulina* sp. pode conter 70% de proteína em peso seco com alta porcentagem de digestibilidade, *Chlorella vulgaris* contém 55%, *Dunaliella* sp. 57% e a *Scenedesmus obliquus* tem um teor de proteína de 25% (OREJUELA-ESCOBAR et al., 2021).

2.1.2.2 Carboidratos

Os carboidratos são reservas de polissacarídeos e constituintes da parede celular. O termo "carboidratos" refere-se a monômeros e polímeros de açúcares e derivados de açúcar. Os polímeros podem ter pesos moleculares variados, compõem coletivamente a maior fração em fontes de biomassa terrestre típicas e podem ter uma função biológica estrutural ou de armazenamento (por exemplo, celulose e amido, respectivamente, em plantas superiores) (TEMPLETON et al., 2012). Ao realizar a restrição de nutrientes no cultivo pode-se alterar a composição das microalgas. A maioria das pesquisas apenas quantifica o conteúdo total de carboidratos em resposta a algumas modificações nas condições de cultivo (ESPINOZA-GALLARDO; CONTRERAS-PORCIA; EHRENFELD, 2017). A fonte e a concentração de nitrogênio afetam o conteúdo de carboidratos. Quando as microalgas assimilam mais carbono, o conteúdo total de carboidratos nos cultivos se incrementa. Os polissacarídeos se constituem na maior forma de manifestação dos carboidratos presentes em todas as espécies de microalgas e representam 91 a 96% do total de carboidratos (RIZZI, 2010).

2.1.2.3 Lipídios

Os lipídios em microalgas têm despertado grande interesse na ciência e na indústria devido ao seu potencial em gerar biocombustíveis. Além da presença de ácidos graxos poliinsaturados - PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*) que atuam na suplementação alimentar, as microalgas possuem uma variedade de outros lipídios, encontrados fazendo parte das membranas, como fosfolipídios, esteróis, lipoproteínas e glicolipídios. A composição dos lipídios pode variar por diversos fatores como a combinação entre luz, nutrientes, nitrogênio e temperatura. Em estudos realizados, se encontrou que as deficiências de nitratos e fosfatos afetam diretamente o conteúdo deste componente (GALARZA, 2019).

2.1.2.4 Pigmentos

Pigmentos são compostos químicos que absorvem radiação na zona do visível. Uma forma tradicional de classificar as microalgas têm sido de acordo com seus pigmentos. Por exemplo, as diatomáceas marinhas devem sua cor dourada à presença de xantofila fucoxantina, enquanto os azul-esverdeados contêm clorofila a e compostos relacionados (GALARZA, 2019).

Como microrganismos fotossintéticos, as microalgas são um dos mais abundantes e variados produtores de carotenoides e clorofilas, sendo os carotenoides a fração mais explorada dos pigmentos das microalgas. Recentemente, foi demonstrado que as microalgas apresentaram perfis de carotenoides e algumas espécies de prevalência de xantófilas sobre carotenos. Entre os carotenoides existem: β -caroteno, α -caroteno, zeaxantina, luteína, violaxantina, echinenona, mixoxantofila e cantaxantina que podem ser isolados, sendo alguns deles produzidos exclusivamente por microalgas (FERNANDES et al., 2020).

2.1.3 *Scenedesmus* sp.

Uma variedade de microalgas aquáticas, incluindo a microalga verde *Scenedesmus*, tem sido estudada devido a sua possível eficácia como recursos biológicos para aplicações como alimento para peixes, alimento humano, nutrientes suplementares humanos e produtos farmacêuticos, e também para a biorremediação de água poluída. *Scenedesmus* é uma microalga dominante em lagos de água doce e rios (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016). Pertencente ao grupo das algas verdes, colônias formadas por células elipsoidais, fusiformes ou ovóides, arranjadas lado a lado (Figura 2.1). A Tabela 2.3 tem a classificação da *Scenedesmus* sp.

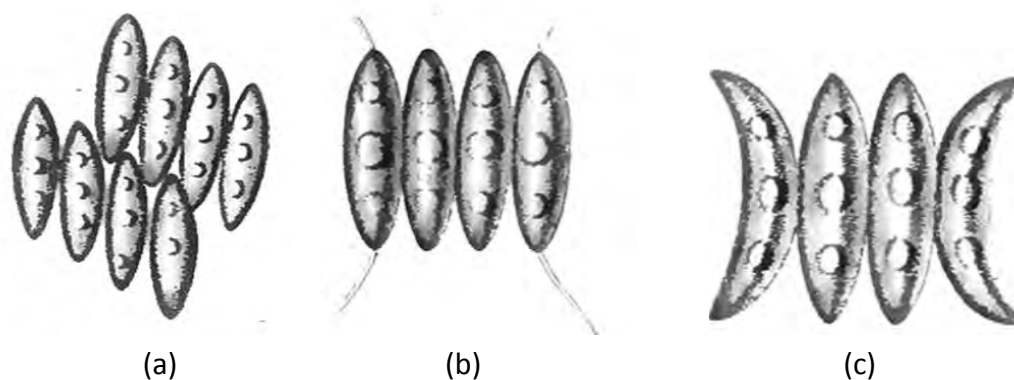


Figura 2.1. Tipos de *Scenedesmus*: (a) *obliqua*, (b) *quadricauda*, (c) *dimorpha* (COMAS GONZÁLEZ, 2020).

Tabela 2.3. Classificação da *Scenedesmus* sp (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016; XU et al., 2019).

Reino	Plantae
Divisão	Chlorophyta
Classe	Euhlorophyceae
Ordem	Chlorococcales
Família	Scenedesmaceae
Gênero	<i>Scenedesmus</i>

Na Tabela 2.4 é possível ver a composição bioquímica de fontes de alimentos humanos e de diferentes espécies de microalga *Scenedesmus*. A *Scenedesmus obliquus* apresentou um teor de proteínas maior ao do ovo, por exemplo. A *Scenedesmus dimorphus* pode atingir valores de até 52% em termos de teor de carboidratos, sendo superior ao leite, além de apresentar um teor de lipídios semelhante ao do ovo. Já a *Scenedesmus acutus* e a *Scenedesmus quadricauda* apresentam teores de proteína superiores aos da soja.

Tabela 2.4. Composição química de fontes de alimentos humanos e diferentes *Scenedesmus* (BECKER, 2013; ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016).

PRODUTO	PROTEÍNAS	CARBOIDRATOS	LIPÍDIOS
Fermento	39	38	1
Arroz	8	77	2
Ovo	47	4	41
Leite	26	38	28
Carne desossada	43	1	34
Soja	37	30	20
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 - 56	10 - 17	12 - 14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1 - 9
<i>Scenedesmus acutus</i>	50 - 60	10 - 17	12 - 14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8 - 18	21 - 52	16 - 40

2.1.3.1 Usos da *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp. foi considerada candidata apropriada para a produção de biocombustível no presente trabalho com base em sua alta produtividade lipídica (24,66 mg.L⁻¹.dia⁻¹), alto rendimento de biomassa (0,9 g.L⁻¹), bem como perfil de ácidos graxos adequado (EIDA; DARWESH; MATTER, 2018).

Resultados obtidos por Tripathi et al. (2015) mostram que a *Scenedesmus* sp. consegue mitigar as emissões de CO₂ e produzir ácidos graxos saturados (33 e 36%) e insaturados (54 e 55%) predominando ácidos graxos C₁₆ ou C₁₈ (>80%), apropriados para a produção de biodiesel. Conforme a Tabela 2.5, os principais ácidos graxos encontrados em *Scenedesmus* sp. foram: ácido palmítico, ácido oleico, ácido linolênico e ácido linoleico.

Tabela 2.5. Composição de ácidos graxos da cepa de microalgas *Scenedesmus* (KUMAR; BANERJEE; JAGADEVAN, 2021).

Tipo de ácidos graxos	% de ácidos graxos totais
Ácido mirístico (C14:0)	1,36 ± 1,7
Ácido pentadecanóico (C15:0)	ND
Ácido palmítico (C16:0)	24,54 ± 2,1
Ácido palmitoleico (C16:1)	2,34 ± 0,21
Ácido esteárico (18:0)	8,27 ± 0,57
Ácido oleico (C18:1)	16,21 ± 1,1
Ácido linoleico (C18:2)	10,42 ± 1,5
Ácido linolênico (C18:3)	12,32 ± 1,3
Ácido araquídico (20:0)	0,98 ± 0,58
Outros	23,56
Ácido graxo saturado total (SFA)	35,15
Ácido graxo monoinsaturado total (MUFA)	18,55
Ácido poliinsaturado total (PUFA)	22,74
Proporção de ácido graxo insaturado/saturado	1,17

Como outras microalgas, *Scenedesmus* sp. é uma rica fonte de compostos bioativos que estão sendo utilizados em benefício da humanidade (Ver Tabela 2.6). Eles têm sido explorados por seus metabólitos ativos que têm sido aplicados em várias indústrias, incluindo farmacêutica, alimentícia, cosmética, energia, aquicultura, medicina e outras (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016).

Tabela 2.6. Metabólitos encontrados de *Scenedesmus* sp. (ISHAQ; PERALTA; BASRI, 2016).

Metabólitos	Aplicação
Vitamina B	Alimentos Saudáveis
Vitamina C	Aditivos alimentares saudáveis, Farmacêutico
Vitamina E	Alimentação Saudável, Medicina
Luteína	Nutrição animal, Farmacêutica
Astaxantina	Aquicultura, Cosméticos, Nutrição Humana, Medicina

Tabela 2.5. Metabólitos encontrados de *Scenedesmus* sp. (Continuação)

Metabólitos	Aplicação
Hemaglutinina	Medicina
β -Caroteno	Corante alimentar, Medicina
Aminoácidos	Cosméticos (compostos de triagem UV)
Clorofila a, b, c	Corantes alimentares, Produtos farmacêuticos, cosméticos
Polissacarídeos	Medicina, Bioetanol, BioH ₂
Extratos com atividade antimicrobiana/antifúngica	Medicina
Ácidos graxos monoinsaturados, poli-insaturados e saturados (ácido oleico, ácido láurico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido α -linoleico, ácido esteárico e outros)	Biodiesel, Farmacêutica, Nutrição Animal e Humana, Aquicultura.
Aminoácidos (isoleucina, leucina, valina, lisina, metionina, cisteína, alanina, arginina, ácido aspártico, glutamina e outros)	Alimentos

2.1.4 Medidas de crescimento de microalgas

Para o acompanhamento do crescimento de microalgas é necessário contar com métodos rápidos de quantificação. O acompanhamento do crescimento, pelas técnicas a seguir, permite determinar o momento ótimo para coleta e utilização da biomassa produzida.

2.1.4.1 Contagem direta por microscopia

A contagem do número de células presentes no meio de cultivo pode ser realizada usando um microscópio e uma câmera de contagem. O crescimento celular pode ser monitorado por meio de contagens celulares diárias com um citômetro, medindo número de células.L⁻¹ (ŞIRIN; SILLANPÄÄ, 2015).

2.1.4.2 Densidade óptica

A densidade celular pode ser monitorada de forma diária usando um espectrofotômetro UV-visível usando medições de densidade óptica (OD) definida. A relação entre um método de quantificação (peso seco ou contagem de células) e a densidade óptica pode ser calculada por meio de ajuste de regressão dos mínimos quadrados dos níveis de absorvância (ŞIRIN; SILLANPÄÄ, 2015). O uso de densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas baseia-se na obstrução física da luz pelas células. Quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz (absorvância) e menor será a passagem de luz pela amostra (transmitância) (LOURENÇO, 2006).

2.1.4.3 Peso seco

O peso seco da biomassa de microalgas pode ser determinado usando o método de medição de sólidos suspensos (SS). A determinação de peso seco consiste basicamente em recolher uma alíquota do cultivo, concentrar por filtração, secar numa estufa e depois pesar e determinar a diferença de pesos (XIN et al., 2010).

2.2 Fatores que influem no crescimento de microalgas

No cultivo de microalgas deve-se considerar o impacto de vários fatores que influenciam no crescimento destes micro-organismos. Num sistema de cultivo pode-se avaliar a importância de fatores como intensidade luminosa, nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), temperatura, pH, além de considerar a agitação do meio, o tipo de agitação e a penetração de luz no sistema.

2.2.1 Intensidade luminosa

A cinética de crescimento de microalgas depende da luz. A intensidade luminosa é um fator importante que deve ser considerado para o cultivo de microalgas, bem como o aumento de escala de fotobiorreatores a serem utilizados. Um dos principais desafios no *upscaling* é o sombreamento da luz e a redução da taxa de crescimento de microalgas relacionados à limitação de luz, resultando num fator crítico (BENNER et al., 2022).

O fotoperíodo (tempo de exposição à luz e escuridão) influencia os ciclos de vida e atividades metabólicas de microalgas. Em condições naturais, a maioria das microalgas se estabelece em períodos alternados de luz: escuridão, porém, na maioria dos laboratórios de microalgas a iluminação é mantida constante sob a qual a divisão celular é favorecida em certas microalgas; quando os ciclos luz: escuridão são usados, é para simular condições naturais ou para sincronizar culturas (BENNER et al., 2022; JANSSEN, 2016). A luz solar pode ser usada, apesar das variações diárias e sazonais nos níveis de luz (CHISTI, 2007).

Para avaliar o efeito do fotoperíodo no crescimento ao longo do tempo de cultivo, existem trabalhos que estudam ciclos de iluminação de 12:12, 16:8, 20:4 e 24:0 horas luz: escuridão (MAHARANI et al., 2020). Praticamente toda a biomassa produzida é gerada durante as horas de irradiação, enquanto durante os períodos de escuridão o crescimento é mínimo e há até uma diminuição (ou perda devido ao consumo durante a respiração celular) da biomassa celular produzida durante o período de luz, mas que dependendo da microalga tem um fotoperíodo que oferece melhores resultados de produção de biomassa (BENNER et al., 2022).

As microalgas utilizam energia luminosa para converter CO₂ em compostos orgânicos, e a falta ou excesso de luz podem limitar o crescimento. Estudos mostraram que intensidades de luz maiores ou menores podem diminuir a densidade celular e as taxas de crescimento. Além disso, mais de 50% da energia luminosa é perdida em altas intensidades devido a restrições cinéticas entre a captura de fótons e a fotossíntese. A fotoinibição é o processo de inibição do crescimento devido ao excesso de luz. Estudos sugerem que a fotoinibição influencia o crescimento das microalgas, causando uma perda de rendimento fotossintético devido a um excesso de irradiância que danifica algumas das principais proteínas do aparelho fotossintético. Além de afetar a fotoaclimatação, a concentração de biomassa, a taxa específica de crescimento e a produtividade de hidrocarbonetos. A microalga é normalmente fotoinibida em intensidades de luz acima da taxa de crescimento de biomassa (μ_{max}), o que resulta em danos irreversíveis (CHANG et al., 2016; HARTMANN et al., 2013; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013).

Wahidin et al. (2013) estudaram a influência da intensidade luminosa e do fotoperíodo no crescimento e conteúdo lipídico da microalga *Nannochloropsis* sp., observaram que o crescimento de microalgas se inibe quando a intensidade da luz é aumentada além da intensidade da luz de saturação. Na natureza, a intensidade está bem acima da saturação e pode ser alta o suficiente para inibir o crescimento durante grande parte do dia. Uma quantidade insuficiente de luz pode diminuir a taxa de crescimento. Nos resultados obtidos, observa-se que o aumento da intensidade da luz para $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ melhorou as taxas específicas de crescimento e divisão. Porém, a fotoinibição causou alterações na cor das células e diminuiu a taxa de crescimento, concluindo que era aconselhável trabalhar com intensidade de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para o cultivo de *Nannochloropsis* sp.

O Sol é a principal fonte de energia da Terra e emite uma vasta gama de comprimentos de onda nos quais apenas a luz ultravioleta (UV), a luz visível e a luz infravermelha (IR) atingem a Terra. Sete por cento da radiação eletromagnética emitida pelo sol está na faixa UV (200–400 nm). À medida que passa pela atmosfera, o fluxo total transmitido é bastante reduzido e a composição da radiação UV é modificada. A radiação UV-C de ondas curtas (200–280 nm) é completamente absorvida pelos gases atmosféricos. A radiação UV-B (280–320 nm) é mais facilmente absorvida pelo ozônio estratosférico e, conseqüentemente, apenas uma pequena quantidade é transmitida à superfície da Terra. Já a radiação UV-A (320–400 nm) é mais facilmente absorvida pelo ozônio. A luz visível está na faixa de 400 a 800 nm. Estudos sugerem que o crescimento das microalgas e a absorção de nutrientes são afetados por diferentes comprimentos de onda de luz, com a luz visível (particularmente LEDs azuis e brancos) promovendo geralmente o crescimento e a luz UV às vezes inibindo o crescimento ou alterando o conteúdo de ácidos graxos (HUANG et al., 2018; HUANG; CHEUNG, 2011; KUMAR et al., 2018; LOPES et al., 2020; ZHANG; JIANG; QIU, 2013).

Lopes et al. (2020) explicam que a radiação UV e visível afetam a produtividade da biomassa e a absorção de nutrientes nas microalgas. Huang e Cheung (2011) mencionam que após exposição à radiação UVA, tanto *N. closterium* quanto *I. zhangjiangensis* sofreram aumentos significativos em seu crescimento em comparação com o controle que foi exposto a somente PAR (*photosynthetically active radiation*: 400–700 nm) tendo aumentos de 1,25 e 1,60 vezes no peso seco, respectivamente. As proporções de ácidos graxos poli-insaturados e carotenóides totais aumentaram significativamente em ambas as microalgas ao serem expostas à radiação UVA e PAR.

2.2.2 Temperatura

Para o crescimento de microalgas, a temperatura é um fator importante e influi diretamente os processos bioquímicos, incluindo a fotossíntese. Cada espécie tem sua própria temperatura ótima de crescimento. Aumentar a temperatura para a faixa ótima aumenta exponencialmente o crescimento de microalgas, mas um aumento ou diminuição da temperatura, além do ponto ótimo, retarda ou até mesmo interrompe o crescimento e a atividade. A faixa de temperatura ótima para a maioria das espécies de algas é de 20°C a 30°C (CHISTI, 2007), embora as algas termófilas, como *Anacystis nidulans*, possam suportar temperaturas de até 40°C e microalgas crescendo em fontes termais possam crescer a temperaturas próximas de 80°C (KHAN; SHIN; KIM, 2018). Zhang et al. (2021) observaram o efeito da temperatura no cultivo de *C. vulgaris*, que apresentou os maiores resultados de biomassa produzida a 25°C. A biomassa produzida baixou em aproximadamente 50% no cultivo mantido a 30°C, indicando que a alta temperatura

proporcionou efeito de inibição excessiva no cultivo de *C. vulgaris* pela inativação da enzima.

2.2.3 Nutrientes

A concentração de nutrientes no meio de crescimento (carbono, fosfatos, nitrogênio) afeta o metabolismo das microalgas. A variação de concentração do nitrogênio causa três alterações principais: diminuição da membrana tilacóide, estimulação da hidrólise de fosfolipídios e ativação de enzimas de síntese de ácidos graxos. Essas alterações causam um aumento do conteúdo de ácidos graxos intracelulares. Geralmente, quando as microalgas são cultivadas sob baixa intensidade de luz, o carbono assimilado é usado para a síntese de aminoácidos e outros componentes essenciais, mas sob condições de saturação de luz são formados açúcares, lipídios e amido (SACRISTÁN DE ALVA et al., 2018).

2.3 Tipos de reatores para cultivo

O cultivo de microalgas ocorre em tanques, lagoas, fotobiorreatores e fermentadores com diferentes configurações e volumes. Em geral, tais aparatos podem ser divididos em reatores tubulares, planos, fermentadores e híbridos. Um dos objetivos desses reatores é a absorção efetiva da radiação solar, enquanto os outros requerem o uso de luz artificial. Os fotobiorreatores são equipamentos projetados para permitir o aproveitamento da energia luminosa, seja ela natural ou artificial, pelas microalgas. Deseja-se que o fotobiorreator ajude a promover o crescimento celular, e para isso foram projetados vários tipos como colunas de bolhas, placas planas e tubulares (cônicas ou helicoidais), entre outros (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

2.3.1 Sistemas abertos

A Figura 2.1 apresenta o esquema de lagoas abertas utilizadas para o cultivo de microalgas.

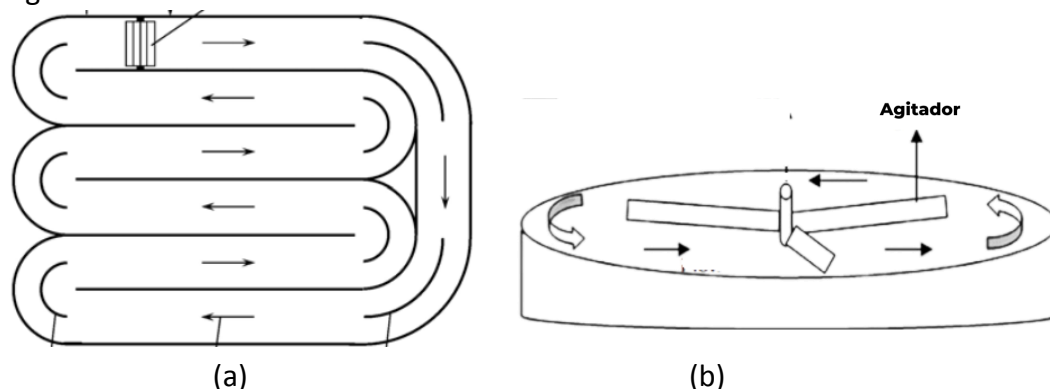


Figura 2.1. Sistemas abertos adaptados ao cultivo de algas: a) lagoa *raceway*, b) lagoas circulares. Adaptado de Chisti (2007) e Sirajunnisa et al. (2016).

Lagoas *raceway* (Figura 2.1a) são abertas, têm tipicamente 0,3 m de profundidade com canais de circuito fechado de recirculação. Defletores são colocados no canal de fluxo para guiar o fluxo. Uma roda de pás é colocada para mistura e circulação. Os canais das pistas são geralmente construídos em base de concreto e revestidos com plástico branco, para obter o máximo de luz disponível. Na presença de luz solar, a cultura é continuamente alimentada na frente da roda de pás onde o fluxo começa e o caldo é colhido atrás da roda de pás na conclusão do ciclo de circulação. Desde o século XIX, as

lagoas *raceway* para cultura em massa de microalgas têm sido utilizadas (PRAKASH; SAHA, 2013). As lagoas circulares (Figura 2.1b) apresentam um braço mecânico no centro para movimentar o cultivo. Uma grande desvantagem das lagoas abertas é a perda de água para a atmosfera por evaporação, especialmente em áreas com pouca água. Este problema quase não existe em fotobiorreatores fechados (SIRAJUNNISA; SURENTHIRAN, 2016).

2.3.2 Sistemas fechados

O princípio de projeto de fotobiorreatores é maximizar a relação superfície/volume e reduzir os custos (ZHU; RONG; ZONG, 2013). A Figura 2.2 apresenta os diferentes tipos de fotobiorreatores fechados.

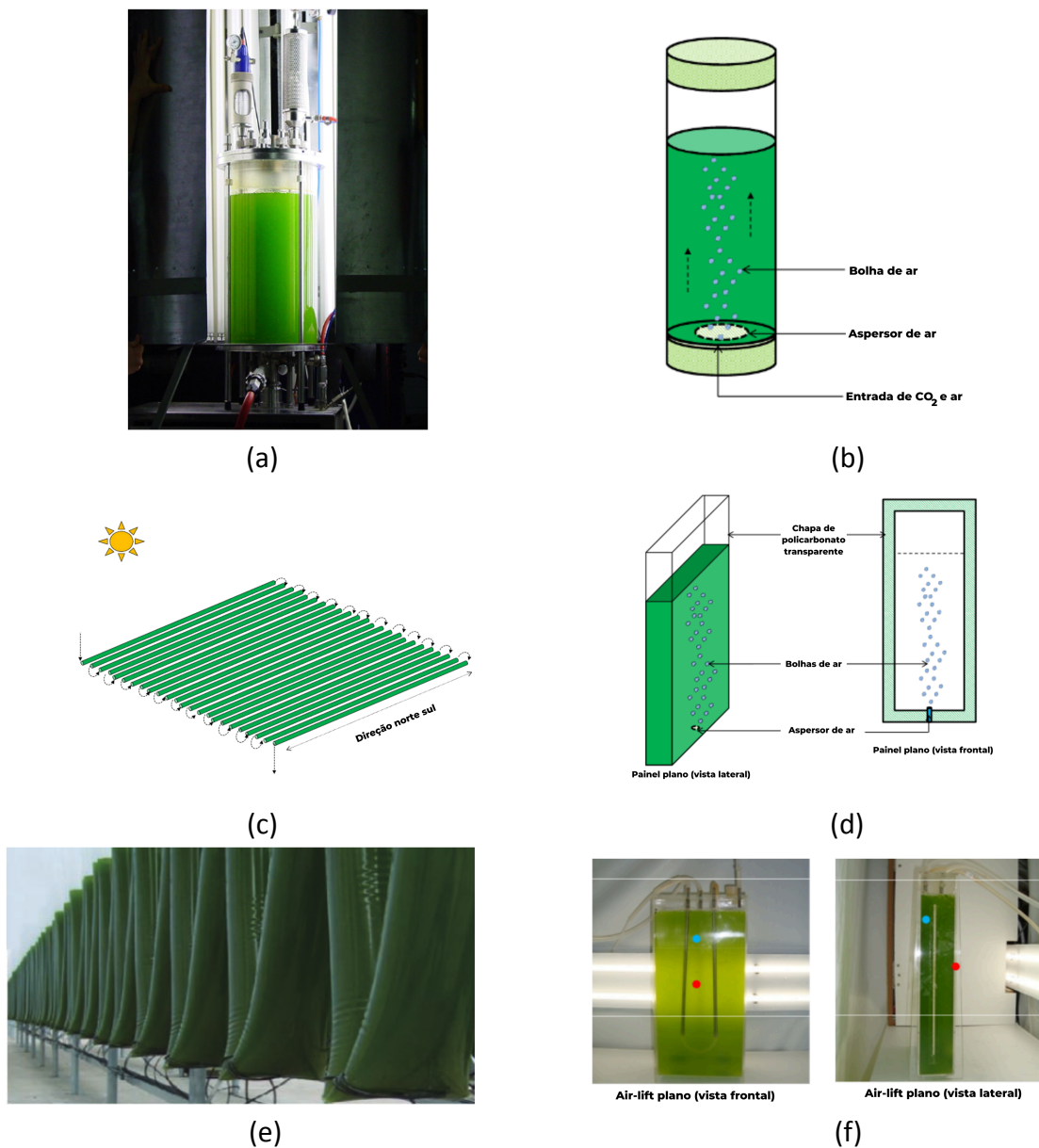


Figura 2.2 Fotobiorreatores fechados: a) Tanque agitado; b) Esquema de coluna de bolhas; c) Esquema de tubular horizontal; d) Esquema de painel plano; e) Saco plástico; f) *Air-lift* plano. Adaptado de Benner et al. (2022), Gris et al. (2013), Gupta et al. (2015) e Huang et al. (2017).

O fotobiorreator de tanque agitado (Figura 2.2a) apresenta boa transferência de calor e massa, boa dispersão de luz, menos problemas de contaminação, design simples e produtividade moderada de biomassa. Porém, tem baixa relação superfície/volume, problema de aquecimento devido à agitação mecânica que requer energia extra, tornando-se caro e não escalável (BENNER et al., 2022; GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

O fotobiorreator de coluna de bolhas vertical (Figura 2.2b) apresenta alta transferência de massa pelo uso de bolhas de ar sem precisar uma estrutura interna complexa nem peças móveis, tem boa mistura com baixa tensão de cisalhamento e menor fotoinibição. As limitações são: baixa área de superfície para iluminação, material de construção caro, aumento de escala limitado devido a restrições de design e problemas de efeito de sombreamento (GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

O fotobiorreator tubular horizontal (Figura 2.2c) propõe uma elevada relação superfície/volume, baixo estresse hidrodinâmico, tornando-se adequado para cultivo ao ar livre, boa produtividade de biomassa, baixo custo e baixo efeito de sombreamento mútuo. Porém, pode apresentar acúmulo de oxigênio dissolvido, suscetível à fotoinibição, incrustação devido ao crescimento de algas, grande necessidade de espaço e regulação deficiente da temperatura (GUPTA; LEE; CHOI, 2015; HUANG et al., 2017).

O fotobiorreator painel plano (Figura 2.2d) apresenta grande superfície de exposição à luz, alta relação superfície/volume, pode ser adequado para cultivo ao ar livre, alta produtividade de biomassa, capacidade de manter acesso uniforme à luz em todo o volume de cultivo, relativamente barato, apresenta alta eficiência de fotossíntese. Pode ser fácil de construir, manter, limpar e operar. Apesar disso, qualquer aumento na escala de produção requer o uso de numerosos módulos e estrutura de suporte, dificuldade no controle da temperatura de cultivo, risco de incrustações e potencial para ocorrência de estresse hidrodinâmico em algumas espécies de algas (GRIS et al., 2013; GUPTA; LEE; CHOI, 2015).

O fotobiorreator de saco plástico (Figura 2.2e) requer baixo custo de capital no curto prazo. No entanto, dependendo do formato apresenta mistura ruim, fragilidade a vazamentos e curto tempo de vida (HUANG et al., 2017).

O fotobiorreator *air-lift* plano (Figura 2.2f) apresenta baixo consumo de energia e tensão de cisalhamento, fácil controle de temperatura, boa mistura e transferência de massa, longa vida útil, alta relação superfície-área iluminada e baixo custo operacional, porém precisa de um alto custo de capital (HUANG et al., 2017).

2.4 Biorremediação com microalgas

As microalgas têm a capacidade de biorremediar contaminantes presentes nas águas residuais, oferecendo uma solução inovadora e atraente para a remediação ambiental. As culturas de microalgas podem ser utilizadas para tratar resíduos municipais, agrícolas, alimentares e industriais, bem como efluentes da aquicultura. Crescem rapidamente e são facilmente cultivadas em ambientes ecológicos, o que as torna uma boa escolha para biofiltração. Os nutrientes primários para as microalgas são os componentes da eutrofia da água, como o fosfato e o nitrato, bem como os gases residuais da indústria e da agricultura, como o dióxido de carbono e o amoníaco (MASOJÍDEK; TORZILLO, 2008). *Scenedesmus*, *Chlorella* e *Desmodesmus* são os três gêneros de microalgas de água doce mais frequentemente encontrados na literatura. A sua capacidade de resistir e crescer com as águas residuais é responsável por isso. Países como os Estados Unidos da América, México, Tailândia, China, Austrália e agora a Europa, têm utilizado microalgas para tratamento de águas residuais há vários anos. Por outro lado, há benefícios na utilização de microalgas marinhas para biorremediação e crescimento, principalmente para

produção de lipídios (GEREMIA et al., 2021; HAMMED et al., 2016; MASOJÍDEK; TORZILLO, 2008).

Os nutrientes para o cultivo de microalgas podem estar presentes em águas residuais, e por isso, que além desses proporcionarem um meio de cultura, as microalgas por sua vez podem tratar efluentes orgânicos. As microalgas formam uma simbiose com bactérias, tão necessária para remover contaminantes orgânicos. As microalgas necessitam de luz e outros nutrientes para a fotossíntese, incluindo nitrogênio e compostos de fósforo nas águas residuais, que precisam ser removidos. Assim, microalgas e bactérias são ideais para tratamento de resíduos agrícolas e industriais. Atualmente, existem trabalhos relacionados ao tratamento de água com diferentes espécies de microalgas. Por exemplo, têm-se cultivos de *Scenedesmus obliquus* no efluente de uma estação de tratamento de águas residuais submetidas a sedimentação e aeração como uma etapa de tratamento secundário (EIDA; DARWESH; MATTER, 2018), a utilização de águas municipais residuais domésticas pós-cloradas de biomassa e produção de lipídios por *Chlorella* sp. em batelada (MUTANDA; KARTHIKEYAN; BUX, 2011), biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris* (BERTOLDI et al., 2007), crescimento da microalga *Scenedesmus abundans* para pré-tratamento de efluente farmacêutico (NAYAK; GHOSH, 2019). Da Fontoura et al. (2017) mostraram que as águas residuais do curtume podem ser utilizadas como fonte alternativa de nutrientes para a produção da microalga *Scenedesmus* sp. O cultivo de *Scenedesmus* sp. apresentou concentração máxima de biomassa ($0,90 \text{ g L}^{-1}$) para a concentração de água residual do curtume de 88,4%. Pena et al. (2019) estudaram o uso de um consórcio de microalgas, coletado de um decantador de tratamento de efluentes desativado, para o tratamento de efluentes de um curtume. O consórcio de microalgas apresentou alto desempenho de crescimento no tratamento de efluentes de curtume em condições de efluente diluído em 50% atingindo remoções de COD, N-NH₃, TKN e P-PO₄⁻ de 51,02%, 99,90%, 82,88% e 91,75% respectivamente.

2.5 Vinhaça

A vinhaça é um líquido derivado da destilação do álcool, resultante da fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou melaço (CETESB, 2015).

2.5.1 Processo de produção de etanol

As matérias-primas para a produção de etanol podem ser fontes à base de açúcar (como beterraba, cana-de-açúcar e melaço), fontes à base de amido (como milho, trigo, arroz e mandioca) ou produtos lácteos (como soro de leite). Existem também as matérias-primas celulósicas que incluem: biomassa herbácea (por exemplo, gramíneas), biomassa lenhosa (madeira macia e dura), resíduos industriais (por exemplo, bagaço, casca de arroz, lodo de papel) e resíduos sólidos urbanos de origem orgânica. O processo de produção de etanol pode ser dividido em quatro etapas principais: pré-tratamento e hidrólise (no caso de fontes de amido e celulose), fermentação, destilação e desidratação (para a produção de etanol anidro). Embora existam algumas diferenças no processamento de matérias-primas de amido, açúcar e lignocelulósicas, muitos aspectos do processo de produção de etanol permanecem os mesmos. As fontes à base de açúcar não requerem processamento para converter os carboidratos em açúcares fermentescíveis, ou seja, a hidrólise. As fontes à base de amido requerem um processo de hidrólise, que no processo enzimático consiste na liquefação e sacarificação para produzir açúcares fermentescíveis. E as fontes celulósicas requerem um pré-tratamento mais

substancial, como hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, para converter a celulose em açúcares fermentescíveis. O processo de fermentação é normalmente operado em batelada, mas pode também ser contínuo ou parcialmente contínuo. A destilação remove o etanol da mistura fermentada, gerando a vinhaça como resíduo. A desidratação do etanol é necessária para produção do etanol anidro, utilizado na mistura com gasolina (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). Um esquema pormenorizado do processo para a produção de etanol está representado na Figura 2.3. A utilização ótima da vinhaça gerada requer uma compreensão de como cada etapa do processo a afeta como subproduto.

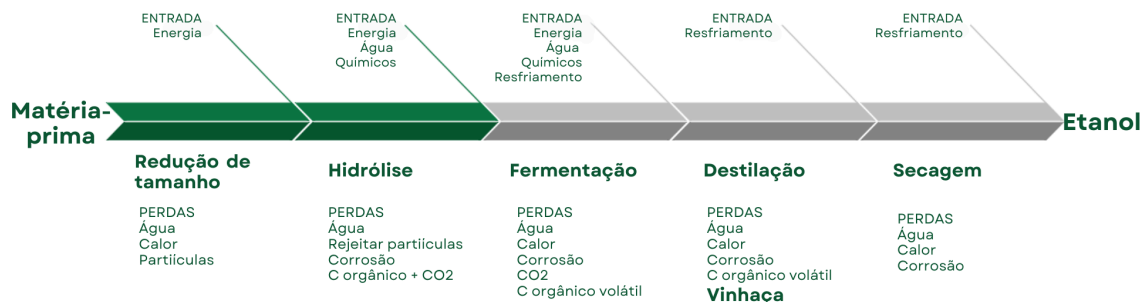


Figura 2.3. Processos de produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas: componentes, entradas e saídas. Adaptado de Wilkie et al. (2000).

Na Figura 2.3 pode ser observado o efeito do pré-tratamento nas características da vinhaça, devido principalmente ao processo e aos reagentes usados para facilitar a hidrólise.

No caso da cana-de-açúcar, realiza-se o corte, depois ela é transportada para a usina. Na usina a cana é lavada e encaminhada para a moagem. Quando a cana é moída surge o suco, que pode ser diluído para se ter uma concentração adequada de açúcares, o resultado é chamado mosto. Após a fermentação do mosto se tem como resultado o vinho, este último passa pela destilação, obtendo-se álcool. O resíduo final da destilação do vinho é a vinhaça. O volume da vinhaça que resulta após a destilação é inversamente proporcional à concentração de etanol no final da fermentação. Portanto, os esforços para assegurar alto teor de etanol vão reduzir o volume de vinhaça e melhorar o consumo de energia e capacidade de destilação (MONTIEL-ROSALES et al., 2022).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo e estima-se que a cada litro de etanol produzido gere entre 10 e 15 L de vinhaça (FUJESS; GARCIA, 2014). Dados da ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) mostram que no país existem 359 plantas produtoras de etanol. Conforme a Figura 2.4 a safra de 2019/2020 atingiu uma totalidade de 32,7 bilhões de litros de etanol. Considerando que para cada litro de etanol são gerados 14 litros de vinhaça, pode-se concluir que foram gerados 457,8 bilhões de litros de vinhaça que precisam ser disponibilizados de alguma maneira (ANP, 2021).

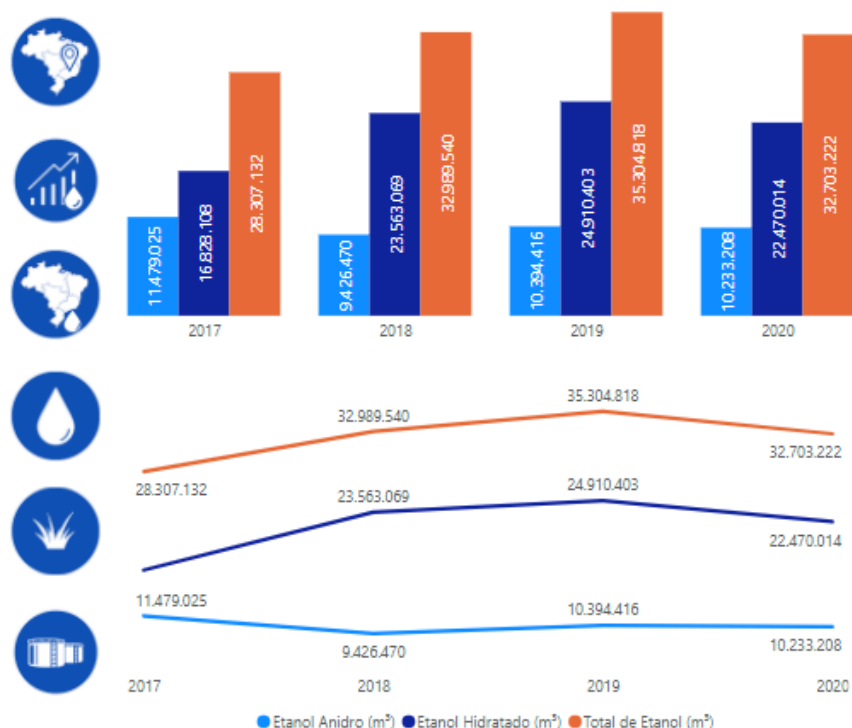


Figura 2.4. Dados de produção de etanol na safra de 2019/2020 (ANP, 2021).

2.5.2 Composição da vinhaça

A composição da vinhaça é muito variável em função de diversos fatores. Um deles diz respeito à sua origem, também às condições de solo e clima e o processo de obtenção de álcool influenciam. O alto teor orgânico da vinhaça é atribuído à presença de lignina, açúcar, hemiceluloses, dextrina, resina e ácido orgânico, além da cor. A cor marrom da vinhaça deve-se principalmente à presença da melanoidina, que resulta da reação não enzimática entre o açúcar redutor e os compostos amino pela reação de Maillard. Além das melanoidinas, a cor das águas residuais da destilaria de melaço é atribuída a polifenóis, produtos de degradação alcalina de hexoses e caramelos em concentrações variadas (GEBREEYESSUS; MEKONNEN; ALEMAYEHU, 2019). As principais características da vinhaça são apresentadas na Tabela 2.7.

Tabela 2.7. Caracterização composicional dos diferentes tipos de vinhaça (SANTOS et al., 2019a).

PARÂMETRO	Tipos de vinhaça de cana de produção		
	anexa de etanol	autônoma de etanol	aguardente de cana
DQOt [mg O ₂ .L ⁻¹]	42.933	17.850	58.533
DQOs [mg O ₂ .L ⁻¹]	35.367	14.517	55.167
DBO [mg O ₂ .L ⁻¹]	23.182	8.792	-
DBO/DQOt	0,54	0,49	-
DQOs/DQOt	0,82	0,81	0,94
pH	4,63	4,50	3,34

2.5.3 Disposição final da vinhaça

No início dos anos 70 a vinhaça era descartada diretamente nos rios, gerando impacto ambiental pela temperatura de descarga e pela alta carga orgânica que contém. Por isto, a Portaria n.º 158, de 3 de novembro de 1980, proíbe o lançamento direto ou indireto de vinhoto em qualquer coleção hídrica, surgindo a necessidade de encontrar alternativas de disposição da vinhaça, que pudesse gerar menor custo para as empresas da indústria sucroalcooleira (BRASIL, 1980).

Uma proposta é o uso de vinhaça como aditivo no alimento para frangos de corte para otimizar o uso de nutrientes na dieta e garantir um comportamento produtivo adequado nos animais, além de reduzir custos (HIDALGO et al., 2009).

Uma alternativa foi utilizar a vinhaça in natura como fertilizante nas plantações de cana-de-açúcar pela fertirrigação (Figura 2.5), devido ao conteúdo de nutrientes presentes e por ser uma alternativa orgânica para reduzir fertilizantes inorgânicos (química), principalmente devido ao alto teor nutricional de baixo custo e as condições químicas do solo. Entretanto, estudos posteriores mostraram que o teor de matéria orgânica e o pH do solo aumentam, tendo um efeito negativo ao longo do tempo (PRAZERES et al., 2019).



(a)

(b)

Figura 2.5. Fertirrigação com vinhaça: a) Usina Açucareira Guaíra Ltda., b) Método utilizado (Fonte FINEP, 2021).

O problema surge após a aplicação da vinhaça pura, que se degrada e gera um cheiro forte que atrai vetores na plantação. Além disso, a infiltração no solo gera um risco de contaminação de água subterrânea e cursos d'água. A aplicação da vinhaça no solo sem o devido monitoramento altera suas propriedades físico-químicas, como cor, pH, condutividade elétrica (CE), etc. devido à lixiviação dos íons orgânicos e inorgânicos. A constante irrigação do solo com o efluente levou a efeitos deletérios nas propriedades do solo e resultou em baixa contagem geral de bactérias e actinomicetos (MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009; SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Ao longo dos anos foram pesquisados outros métodos de tratamento visando reutilizar a vinhaça ou reduzir a toxicidade. Algumas alternativas de tratamento incluem: processos convencionais anaeróbicos e aeróbicos, fitorremediação, métodos físico-químicos convencionais e até processos oxidativos avançados. No entanto, precisam de maior investigação para saber o real potencial de aplicações dessas tecnologias à vinhaça. Além disso, uma única tecnologia não pode ser suficiente para gerenciar a vinhaça (FUSS; GARCIA, 2014).

Durante vários anos as microalgas têm sido usadas para diferentes objetivos, sendo desenvolvidas várias pesquisas para determinar as condições ótimas para o crescimento de espécies específicas. A produção de etanol gera dióxido de carbono e nutrientes

existentes na vinhaça, os quais são uma boa fonte para o crescimento de microalgas, ao mesmo tempo, em que o cultivo de microalgas permite o consumo destes resíduos presentes no processo de produção de etanol (HE et al., 2017; XIN et al., 2010).

Doušková et al. (2010) propuseram utilizar a vinhaça de bioetanol para a produção de biogás em um fermentador anaeróbio, utilizar posteriormente o biogás como fonte de dióxido de carbono para o cultivo de microalgas em fotobiorreator. Uma vez que o biogás é produzido, o digerido (água residual do fermentador anaeróbico) é posteriormente processado em fertilizante à base de amônia. O fertilizante é utilizado diretamente como fonte de nitrogênio para as microalgas e/ou para a produção de licor de amônia, o qual é então utilizado para absorver o dióxido de carbono do biogás visando obter gases ricos em metano. Seyedin et al. (2020) observaram que a vinhaça digerida anaerobicamente, rica em nitrogênio-amônia (478 mg.L^{-1}) e fósforo (508 mg.L^{-1}), oferece grande potencial para ser utilizada como fonte de nutrientes para o cultivo, porém a alta concentração de amônia é inibitória ao crescimento de microalgas. Assim, é necessário reduzir esse conteúdo para oferecer uma proporção que permitisse o cultivo de microalgas. Nos resultados houve um aumento dramático de bactérias durante o cultivo de algas. Ramirez et al. (2014) têm cultivado microalga *Scenedesmus* sp em meio de cultivo contendo até 40% de vinhaça, gerando um efluente tratado sem presença de nitrogênio nem fosforo e com pH igual a 7.

2.6 Colheita de biomassa

Existem diferentes processos que podem ser utilizados na colheita de biomassa de microalga. Alguns métodos de separação para colheita são listados na Tabela 2.8, bem como sua demanda energética.

Tabela 2.8. Métodos de colheita de microalgas (BARCELLOS, 2024; HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK, 2021).

Método	Microalga	Requerimento de Energia
Centrifugação	<i>Tetraselmis suecica</i>	8 kWh.m^{-3}
Coagulação	<i>Tetraselmis suecica</i>	$0,07 \text{ kWh.m}^{-3}$
Eletrocoagulação-floculação	<i>Chlorella vulgaris</i>	$1,3 \text{ a } 9,5 \text{ kWh.kg}^{-1}$
Eletrocoagulação-floculação	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$0,2 \text{ a } 0,4 \text{ kWh.kg}^{-1}$
Flotação	<i>Chlorella vulgaris</i>	$0,09 \text{ a } 0,15 \text{ kWh.kg}^{-1}$
Tecnologias de membranas	<i>Dictyosphaerium</i> sp.	$2,9 \text{ a } 11,1 \text{ kWh.m}^{-3}$
Tecnologias de membranas+Centrifugação	<i>Chlorella vulgaris</i>	$0,77 \text{ a } 0,84 \text{ kWh.m}^{-3}$
Filtração de fluxo tangencial	<i>Tetraselmis suecica</i>	$2,06 \text{ kWh.m}^{-3}$

Barcellos (2024) utiliza o método de imobilização da microalga *Scenedesmus* sp. com alginato. Nos sistemas com células imobilizadas, a colheita é realizada pelo método de peneiramento simples, que não exige altos consumos de energia. O custo do material para imobilização (alginato) é de aproximadamente US\$ 0,2 por m^3 de volume de cultura, o que torna o uso do método de células imobilizadas com alginato atraente por ser viável economicamente.

2.6.1 Centrifugação

A centrifugação é o processo em que dois tipos de substâncias imiscíveis são separadas por uma alta força gravitacional. Em geral, esse tipo de técnica é aplicada para a produção de metabólitos secundários. A centrifugação é o método de separação mais utilizado para a colheita de microalgas, devido à sua alta eficiência de colheita, que é superior a 90%. Uma das principais desvantagens deste método é o alto consumo de energia. A centrifugação também expõe as células de microalgas a altas forças de cisalhamento que podem danificar as células de microalgas e causar o vazamento de substâncias poliméricas intracelulares na suspensão de microalgas. Com base na quantidade de biomassa colhida e na eficiência de remoção de microalgas pode ser economicamente incompatível, devido ao alto consumo de energia e alto investimento de capital para a produção dos produtos (YIN et al., 2020).

2.6.2. Flotação

A colheita por flotação é adequada para microalgas pequenas e unicelulares. As vantagens dos métodos de separação por flotação são os pequenos requisitos de espaço e o curto tempo de operação. A desvantagem da flotação por ar dissolvido e flotação por ar disperso é a necessidade de adições químicas para induzir e aprimorar todo o processo de separação. Esses produtos químicos podem contaminar a biomassa final de microalgas. As eficiências de colheita estão resumidas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Eficiência de separação de biomassa de microalga usando: Flotação com microesferas, Flotação por ar disperso, ou Flotação por ar dissolvido (HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK, 2021).

Método	Microalga	Condição	pH	Eficiência (%)
Flotação com microesferas	<i>Chlorella vulgaris</i>	Microesferas	9	96,16 - 98,43
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Microesferas	7,5	75,38 - 88,52
Flotação por ar disperso	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Saponina	Alcalino	22,5
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Quitosana	Neutro	≥93
Flotação por ar dissolvido	<i>Chlorella vulgaris</i>	Al ₂ (SO ₄) ₃	5, 7, 9	≥99
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Al ₂ (SO ₄) ₃	5, 7, 9	≥99
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Quitosana	Alcalino	≥93

Conforme descrito na Tabela 2.8, alguns métodos de flotação podem ser: Flotação com microesferas (BBF - *buoyant-bead flotation*) que consiste no uso de microesferas de baixa densidade com flotação de ar em vez de bolhas. Essas microesferas transportam as microalgas suspensas para a superfície do líquido, onde as microalgas são removidas. O processo BBF consiste em três etapas principais: colisão, fixação e desprendimento de algas e microesferas. Floculantes são geralmente adicionados ao sistema BBF para promover a fixação de microalgas em microesferas e, em seguida, para aumentar a eficiência de colheita de microalgas (ZOU et al., 2018). Na Flotação por ar disperso (DiAF - *Dispersed-Air Flotation*), o ar comprimido é forçado através dos poros dos discos de vidro sinterizado para produzir bolhas com diâmetros variando geralmente de 75 a 655 µm. Na Flotação por ar dissolvido (DAF - *Dissolved-Air Flotation*), o ar é primeiro pressurizado com

água em um recipiente de saturação e depois é liberado mediante válvulas agulha na célula de flotação à pressão atmosférica. A faixa de diâmetro típica relatada para bolhas geradas usando DAF é de 10 a 120 μm , com uma média de 40 μm . Na flotação por ar disperso e por ar dissolvido é necessária a adição de reagentes químicos para induzir e aprimorar todo o processo de separação (DAFNOPATIDOU; LAZARIDIS, 2008; HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK, 2021).

2.6.3 Sedimentação

A sedimentação por gravidade é um método de separação sólido-líquido pelo qual a pasta concentrada é sedimentada sob a força da gravidade e deixando acima um sobrenadante líquido visivelmente claro. A sedimentação por gravidade pode ser designada pela lei de Stokes, que afirma que a velocidade de sedimentação é linearmente correlacionada às características de deformação, ou seja, raio e densidade das células. A sedimentação não é uma técnica adequada para células de microalgas de tamanho pequeno. A adição de coagulante/floculante à suspensão antes da sedimentação por gravidade melhora a eficiência do processo. Além disso, separadores de lamelas e tanques de sedimentação também são usados para melhorar a taxa de afundamento, e se apresentam econômicos (MATHIMANI; MALLICK, 2018).

É possível recuperar biomassa de microalgas combinando a floculação com a sedimentação, não requerendo investimento de capital significativo e o consumo de energia associado ao processo é insignificante, tornando-se uma das estratégias economicamente mais competitivas para a colheita de biomassa de microalgas em grande escala para fins de biorrefinaria (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013). Sais metálicos, como o sulfato de alumínio, são floculantes eficazes, baratos, prontamente disponíveis com uma longa história de uso em processos comerciais de tratamento de água (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016). A floculação associada à sedimentação foi estudada para a separação de microalgas: Chatsungnoen e Chisti (2016) usaram sulfato de alumínio como floculante por ser considerado barato e seguro. A dosagem ideal de floculante foi de 229 mg.L^{-1} com uma eficiência de 86% em um processo contínuo de floculação-sedimentação.

2.7 Quantificação de lipídios de microalgas

A importância dos lipídios de microalgas tem sido amplamente reconhecida devido à sua alta concentração de ácidos graxos essenciais e suas aplicações em diversas indústrias, como a produção de biocombustíveis, alimentos funcionais e produtos farmacêuticos. A quantificação precisa e eficiente desses lipídios durante o cultivo de microalgas é de fundamental importância para otimizar o processo de produção e garantir sua rentabilidade. Existem vários métodos de quantificação de lipídios de microalgas, cada um com suas vantagens e desvantagens (HOUNSLOW et al., 2017; PATEL et al., 2019; YAO et al., 2015). Entre os métodos mais comumente utilizados estão a extração de lipídios com solventes orgânicos e a espectroscopia de fluorescência (Tabela 2.10).

Tabela 2.10. Resumo das técnicas de quantificação lipídica em microalgas. Adaptado de Hounslow et al. (2017).

Técnica	Vantagens e desvantagens
Método gravimétrico: Bligh and Dyer Clorofórmio Metanol 1:2	Vantagens: Medição direta Desvantagens: Extrai outros compostos além de lipídios, requer grandes quantidades de cultura
Método gravimétrico: Folch Clorofórmio Metanol 2:1	Vantagens: Medição direta Desvantagens: O tipo de solvente favorece certos tipos de lipídios
Método gravimétrico: Soxhlet: hexano e uso de extrator soxhlet	Vantagens: Medição direta Desvantagens: O tipo de solvente favorece certos tipos de lipídios
Método gravimétrico: Cequier-Sanchez: diclorometano em vez de clorofórmio	Vantagens: Solventes usados são menos tóxicos Desvantagens: O tipo de solvente favorece certos tipos de lipídios
Espectroscopia de fluorescência: corante Vermelho de Nilo	Vantagens: In situ. Procedimento relativamente rápido, pode processar muitas amostras de uma só vez. Desvantagens: Varia entre as espécies, pois a penetração da parede celular e a concentração do corante devem ser otimizadas
Espectroscopia de fluorescência: BODIPY	Vantagens: In situ. Procedimento relativamente rápido, pode processar muitas amostras de uma só vez. Desvantagens: Mostra menor correlação de quantificação com outros métodos em comparação com Vermelho de Nilo
Extração colorimétrica de lipídios e reação com revelador de cor: Fosfo-vanilina	Vantagens: Pode ser feito em pequenos volumes Desvantagens: Depende da extração, o sinal diminui com comprimento de cadeia inferior a 12 carbonos, sendo difícil detectar cadeias menores

2.7.3 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência bidimensional é um método rápido e menos agressivo que permite medir propriedades de interesse de sistemas biológicos (microrganismos e metabólitos químicos). Recentemente, a espectroscopia de fluorescência tornou-se um dos métodos preferidos para monitorar bioprocessos que pode ser facilmente implementado para quantificação de lipídios. Os dados são definidos pela intensidade de fluorescência e podem ser correlacionados com outro método de quantificação como, por exemplo, o peso seco (GUSBETH et al., 2016; PATEL et al., 2019). Este método utiliza a propriedade dos lipídios de emitirem fluorescência em resposta à excitação por uma determinada faixa de comprimento de onda. A fluorescência emitida é medida e correlacionada com a concentração de lipídios presente na amostra. A principal

vantagem da espectroscopia de fluorescência é sua rapidez, uma vez que é um método não-destrutivo e não requer a extração prévia dos lipídios da matriz celular. Além disso, é um método relativamente econômico e simples de ser realizado, alcançando resultados em tempo real. Contudo, é importante mencionar que a espectroscopia de fluorescência pode sofrer interferências de outros compostos presentes nas células de microalgas, o que pode comprometer a precisão dos resultados obtidos (ALEMÁN-NAVA et al., 2016; WANG et al., 2019).

Ao longo do cultivo de microalgas, é crucial acompanhar a variação da concentração de lipídios. Esse monitoramento permite identificar os momentos ideais para a coleta das microalgas, as condições ótimas de cultivo, além de auxiliar na previsão da produtividade de lipídios. A espectroscopia de fluorescência tem se mostrado uma ferramenta eficiente para o acompanhamento em tempo real da variação dos lipídios durante o cultivo de microalgas (GUSBETH et al., 2016; SÁ et al., 2017).

A espectroscopia de fluorescência pode exigir o uso de corantes fluorescentes para quantificar o conteúdo lipídico em culturas de microalgas. Isto envolve colocar uma solução corante na amostra, permitindo que o corante atravesse a parede celular da microalga, criando uma interação corante/lipídio que pode ser analisada por espectroscopia de fluorescência. Os corantes comercialmente disponíveis com estas características são Vermelho de Nilo e BODIPY 505/515. O corante Vermelho do Nilo é amplamente utilizado como marcador de lipídios e pode ser usado como uma sonda seletiva para lipídios neutros, selecionando os comprimentos de onda de excitação e emissão ou aplicando técnicas de modelagem quimiométrica baseadas em dados. A Tabela 2.11 mostra que os comprimentos de onda de excitação e emissão variam significativamente para diferentes microalgas, tornando o método com Vermelho de Nilo menos preciso para diferentes espécies (ALEMÁN-NAVA et al., 2016; GOVENDER et al., 2012; REN et al., 2015; RUMIN et al., 2015).

Tabela 2.11. Pares de comprimento de onda de excitação/emissão utilizados na determinação de lipídios de microalgas usando espectroscopia de fluorescência e corante vermelho do Nilo (REN et al., 2015).

Microalga	Excitação [nm]	Emissão [nm]
<i>Alexandrium minutum</i> CBA5	547	580
<i>Ankistrodemus pseudobraunii</i>	530	575
<i>Botryococcus braunii</i> FACHB-357	480	580
<i>Chaetoceros calcitrans</i> 1085/3	480	590
<i>Chaetoceros socialis</i> CBA2	547	580
<i>Chlorella protothecoides</i>	488	570
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	480	580
<i>Chlorella saccharophila</i>	500	578
<i>Chlorella vulgaris</i>	530	570
<i>Chlorella zofingiensis</i>	490	580
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	530	575
<i>Dunaliella primolecta</i>	480	590
<i>Dunaliella salina</i>	488	580
<i>Micractinium pusillum</i>	470	570
<i>Microcystis aeruginosa</i>	480	580
<i>Nannochloris</i> sp.	530	575
<i>Nannochloropsis</i> sp.	480	575
<i>Nitzschia closterium</i>	530	575
<i>Palmellococcus miniatus</i>	530	575
<i>Pseudochlorococcum</i> sp.	490	580
<i>Skeletonema marinoi</i> CBA4	547	580

2.8 Pirólise rápida de microalga

A pirólise rápida é uma técnica promissora que envolve a decomposição térmica da biomassa na ausência de oxigênio. Este processo ganhou atenção significativa nos últimos anos devido ao seu potencial para converter biomassa em produtos valiosos. A pirólise é um processo de conversão termoquímica que decompõe moléculas orgânicas complexas em compostos mais simples a temperaturas elevadas. A pirólise rápida, como o nome sugere, é um método rápido e energeticamente eficiente em comparação com a pirólise lenta tradicional. A pirólise pode ser realizada em vários tipos de reatores como de leito fluidizado e a vácuo. Normalmente envolve o aquecimento da biomassa a temperaturas que variam de 400°C a 600°C em um curto tempo de residência (de alguns segundos). O processo rápido de pirólise produz biochar, bio-óleo e gás em diferentes proporções, dependendo do tipo de microalga utilizada e das condições de processamento empregadas (BRIDGWATER, 2012; DE MORAIS et al., 2023; FRANCAVILLA et al., 2015; HARMAN-WARE et al., 2013; KIM; KOO; LEE, 2014). Na pirólise, em geral, fatores como composição da biomassa, tipo de processo de pirólise usado, temperatura, pressão,

tempo de residência dos gases pirólíticos, taxa de aquecimento e tipo de reator impactam o rendimento e a composição dos produtos de pirólise (DE MORAIS et al., 2023).

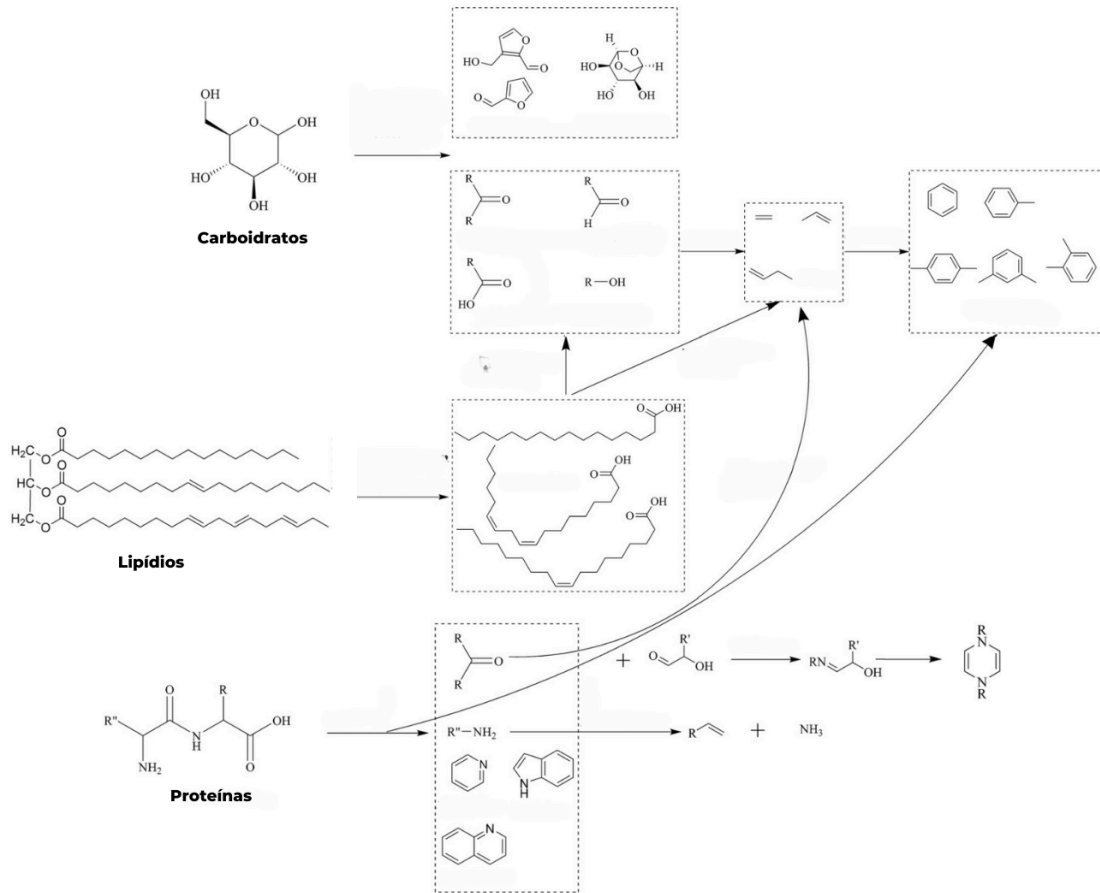


Figura 2.6. Postulado de vias químicas de componentes de microalgas na pirólise. Adaptado de Yang et al. (2019).

A biomassa de microalgas consiste principalmente em proteínas, lipídios e carboidratos, a composição pode variar segundo o tipo de microalga. A Figura 2.6 descreve possíveis vias de reação para a pirólise de microalgas, que envolvem reações de hidrólise, craqueamento e desidratação. Os carboidratos nas células de microalgas são polissacarídeos e oligossacarídeos, sendo os principais produtos pirólíticos os açúcares anidros e os furfurais. Outras reações incluem descarboxilação, desoxigenação e ciclização, que podem resultar em cetonas, aldeídos, ácidos e álcoois. As olefinas podem ser convertidas em hidrocarbonetos aromáticos por meio de reações de ciclização e aromatização. As proteínas produzem a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos e compostos N-heterocíclicos, enquanto os aminoácidos sofrem desaminação, metilação direta, descarboxilação, desidratação, decarbonilação, ciclização e dimerização. As proteínas podem combinar-se com carboidratos através da sequência de reações de Maillard para formar uma variedade de compostos aromáticos como fenóis, piridinas, pirróis e indóis (YANG et al., 2019).

Aravind et al. (2020) mencionam que durante a pirólise das microalgas, a decomposição de proteínas e carboidratos ocorre a temperaturas abaixo de 400°C, enquanto os lipídios se decompõem ao aumentar principalmente a temperatura para cerca de 550°C. Mustapha et al. (2023) determinaram os rendimentos de produtos de pirólise (bio-óleo, biochar e gás) a partir de biomassa de microalga *Scenedesmus obliquus* sob diferentes temperaturas.

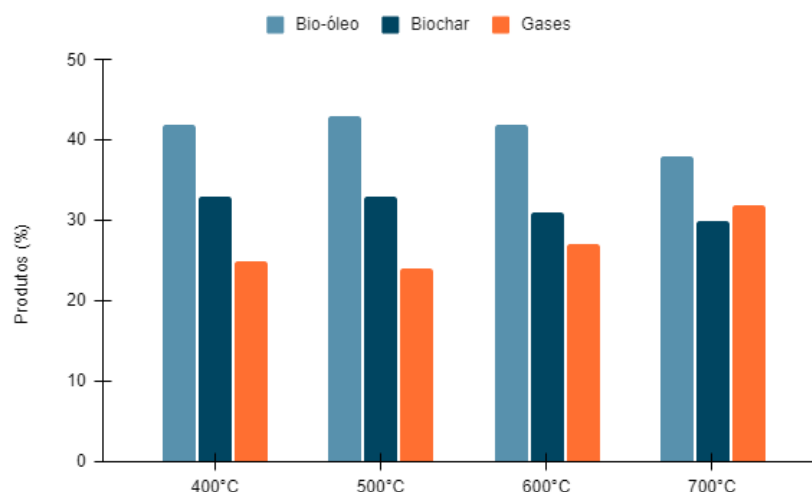


Figura 2.7 Rendimento de produtos da pirólise de microalgas em diferentes temperaturas. Adaptado de Mustapha et al. (2023).

Na Figura 2.7 verifica-se que aumentos de temperatura de 400°C para 500°C resultaram em um aumento no rendimento de bio-óleo de 44,68% em peso para 46,37%, na temperatura de 600°C o rendimento de bio-óleo foi de 43,05%. No entanto, aumentando a temperatura para 700°C, observa-se uma diminuição no rendimento do bio-óleo para 40,38%. Mustapha et al. (2023) compararam os resultados obtidos com os de trabalhos anteriores e observaram que a faixa de temperatura ideal para a produção de bio-óleo pirolítico a partir de microalgas é de 400 a 600°C.

Estudos preliminares com a planta de pirólise existente no GIMSCOP (Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos) mostraram que a pirólise de biomassa deve ser realizada a 600 °C, já que o bio-óleo de ensaios anteriores (utilizando diferentes biomassas) foi obtido como produto majoritário apenas a essa temperatura. No trabalho de dissertação de Raymundo (2016) é explicado que existe uma tendência diferente daquela encontrada na literatura no que diz respeito à interação entre temperaturas de pirólise e rendimento de líquidos e gases.

A pirólise rápida da biomassa microalgal oferece um método sustentável e eficiente para converter biomassa em produtos valiosos. O biochar, o bio-óleo e o gás produzidos durante o processo têm diversas aplicações, que vão desde a correção do solo e produção de energia até combustíveis e matérias-primas químicas. As características únicas das microalgas fazem delas uma matéria-prima ideal para pirólise rápida, proporcionando uma oportunidade para abordar as crescentes preocupações ambientais associadas ao consumo de combustíveis fósseis (BRIDGWATER, 2012; DE MORAIS et al., 2023; YANG et al., 2019).

2.8.1 Biochar

O biochar é um produto sólido escuro, com baixa área superficial e baixa capacidade de troca catiônica, com pH, teor de cinzas e nitrogênio, e nutrientes inorgânicos extraíveis altos. É formado durante a pirólise quando componentes voláteis são liberados da biomassa. Tem grande potencial como corretivo do solo devido à sua capacidade de melhorar a fertilidade do solo, reter umidade e sequestrar dióxido de carbono. Além disso, o biochar pode ser utilizado para produção de energia por meio de processos de combustão ou gaseificação (HARMAN-WARE et al., 2013; SHEN; WU, 2023). Também pode ser processado para se tornar um material funcional como suporte de catalisador. A pirólise lenta é considerada um método viável para a produção de biochar, pois seu longo

tempo de residência maximiza o rendimento de resíduos sólidos. Os rendimentos de biochar variam de 15 a 43% em peso de biomassa microalgal bruta (YANG et al., 2019).

2.8.2 Bio-óleo

O bio-óleo, outro produto valioso da pirólise rápida, é uma mistura complexa de compostos orgânicos. Tem semelhanças com o petróleo convencional, o que o torna um substituto potencial para os combustíveis fósseis. Além disso, as microalgas possuem maior teor de óleo em comparação com a biomassa lignocelulósica, tornando-as uma fonte atraente para a produção de bio-óleo. A composição do bio-óleo de microalgas varia dependendo do tipo de microalga utilizada, mas geralmente contém ácidos graxos, hidrocarbonetos, fenóis e compostos contendo nitrogênio (Tabela 2.12). É essencial compreender as características específicas do bio-óleo de microalgas para otimizar a sua utilização e explorar potenciais aplicações. O bio-óleo pode ser processado posteriormente para remover impurezas e melhorar sua qualidade, tornando-o adequado para uso na geração de energia, combustíveis para transporte e matérias-primas químicas (DE MORAIS et al., 2023; HU et al., 2013; KIM; KOO; LEE, 2014; NYONI; HLANGOTHI; HLABANO-MOYO, 2022).

Tabela 2.12. Abundância relativa de grupos de compostos presentes no bio-óleo de pirólise rápida de microalgas em diferentes temperaturas.

Grupos de compostos no bio-óleo	<i>Scenedesmus</i> sp., 440°C (KIM; KOO; LEE, 2014)	<i>Scenedesmus obliquus</i> , 500°C (MUSTAPHA et al., 2023)	<i>Botryococcus braunii</i> , 550°C (MUSTAPHA et al., 2021)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> , 600°C (FRANCAVILLA et al., 2015)
Alifáticos (%)	21,47	37,54	13,62	3,25
Fenóis (%)	4,56	4,64	-	9,87
Aromáticos (%)	3,82	1,27	16,12	2,58
Álcoois (%)	12,03	2,31	45,52	30,25
Compostos nitrogenados (%)	9,69	5,92	-	7,23
Ác. carboxílicos e ésteres (%)	36,53	27,78	10,81	27,55

Harman-Ware et al. (2013) mencionam que o bio-óleo de pirólise de *Scenedesmus* sp. produz uma quantidade significativa de compostos oxigenados como álcoois, cetonas, ácidos e aldeídos, derivados da pirólise de ácidos graxos e triglicerídeos nas microalgas. Observa-se fitol, derivado da clorofila, além da presença de produtos nitrogenados, sendo a maioria aminas, nitrilos e amidas.

2.8.3 Gás

Durante a pirólise rápida, uma quantidade significativa de gás também é produzida. Este gás consiste principalmente em dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano e vários compostos orgânicos voláteis. A composição do gás depende da matéria-prima de biomassa e das condições de pirólise. O gás pode ser utilizado para geração de calor e energia ou processado para a produção de gás de síntese, que pode ser posteriormente convertido em combustíveis e produtos químicos (ARAVIND et al., 2020; DU et al., 2021).

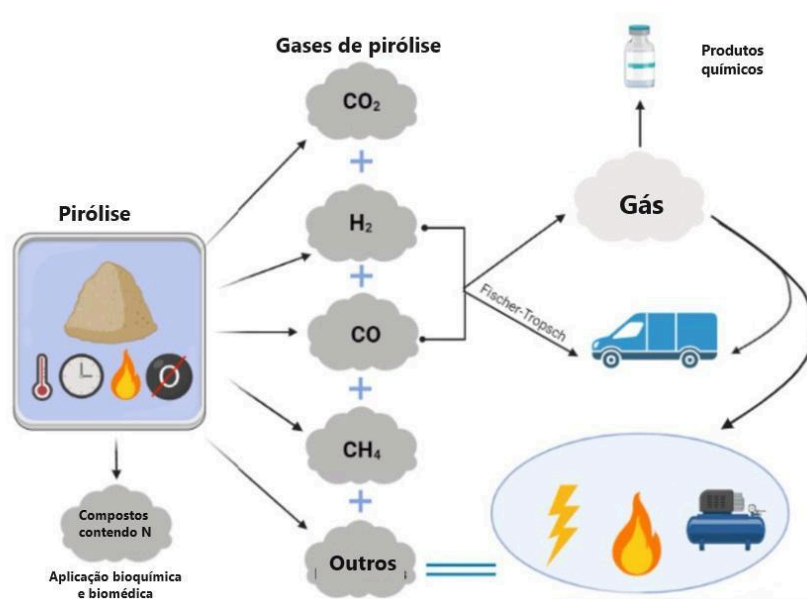


Figura 2.8. Aplicações de gás produzido por pirólise (DE MORAIS et al., 2023).

A Figura 2.8 mostra algumas aplicações do gás de pirólise, a principal aplicação é a geração de energia térmica e elétrica. H₂ e CO podem servir como matérias-primas para a síntese de hidrocarbonetos por meio de vias termoquímicas, como o processo Fischer-Tropsch, e são os principais componentes do gás de síntese. A quantidade de gás produzido aumenta em temperaturas mais altas e a composição do gás é afetada pela temperatura também. Em temperaturas mais baixas, o CO₂ é o produto primário devido ao craqueamento e reformação de moléculas contendo carbonila e carboxila da biomassa de microalgas. À medida que a temperatura aumenta, a produção de CO₂ diminui enquanto a produção de H₂, CH₄ e CO aumenta. A produção de H₂ é atribuída a reações intermediárias de desidrogenação e craqueamento secundário de carboidratos, proteínas e lipídios. A liberação de CH₄ é fornecida principalmente por reações finais de fissão de cadeia de ácidos alifáticos de cadeia longa e compostos contendo nitrogênio de cadeia longa em lipídios e proteínas (DE MORAIS et al., 2023).

Capítulo 3 - Microalgae cultivation using plastic bags as photobioreactor and analysis of UV radiation effects

Abstract: Biofuels from microalgae are an alternative to fossil fuels, but they are currently not economically feasible. The production cost of biofuel from microalgae is a factor that can be reduced through the use of efficient bioreactor design. This work seeks to reduce the cost related to the use of low-cost photobioreactors. First, microalgae *Scenedesmus* sp. were cultivated in low-cost photobioreactors and compared with an air-lift photobioreactor. The results showed significant viability, obtaining maximum productivity of $0.529 \text{ g.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ and a maximum concentration of 3.723 g.L^{-1} . It was observed that ultraviolet light might influence the growth of microalgae. Therefore, new experiments were carried out using different UV filters. In experiments without UV light, the maximum concentration and average productivity were 22% and 24% lower, showing that UV radiation influences microalgae growth.

Keywords: microalgae; *Scenedesmus* sp.; photobioreactor; UV radiation; plastic bags

3.1 Introduction

The depletion of fossil fuel sources urges the need to find new clean energy resources. Microalgae is an interesting feedstock for biofuel production, depending on the species and culture medium. They can produce significant amounts of polysaccharides (sugars) and triglycerides (fats), which are essential for the production of many products, including bioethanol and biodiesel (BATISTA et al., 2018; MATA et al., 2012; RAJKUMAR; YAAKOB; TAKRIFF, 2013; THEIN et al., 2014). In addition, microalgae have been the focus of numerous biotechnology research due to their wide range of products. In this sense,

microalgae cultivation has been carried out to produce biomass for food processing and obtain natural compounds with high added value (NICCOLAI et al., 2019; PŁACZEK; PATYNA; WITCZAK, 2017). Among the numerous extracted compounds with potential commercialization may be related carotenoids, vitamins, sterols, and several bioactive compounds (antioxidants, cholesterol-lowering, etc.), which may be employed especially in developing functional foods for their nutritional and pharmaceutical properties (ANDRADE et al., 2018a; PETRUK et al., 2018; SIRAJUNNISA; SURENHIRAN, 2016).

According to Płaczek (2017), microalgae biomass can be produced in various bioreactor designs in which light, size, design, and agitation mechanisms can be controlled. Miranda et al. (2012) emphasize the versatility of the microalgae production process, both concerning the energy source used and the production method. Open tanks and photobioreactors are used as microalgae production systems. The simplest and cheapest solution for large-scale microalgae biomass production is cultivation in open ponds, but they face problems like pollution, so it needs closed photobioreactors to overcome these problems (GUPTA; LEE; CHOI, 2015). Photobioreactors may be of several types, such as tubular, flat, or column photobioreactors. Tubular and flat plate photobioreactors are reliable for the engineering and operation of algal biofuel production. Flat plate photobioreactors are the oldest forms of a closed production system for microalgae, and they have a large surface area available for illumination, allowing the capture of maximum solar energy available and better photosynthetic efficiency than tubular photobioreactors (PŁACZEK; PATYNA; WITCZAK, 2017; PRAKASH; SAHA, 2013; ZHU; RONG; ZONG, 2013).

Photobioreactors play a decisive role. Growing microalgae might be expensive using closed systems, so an interesting alternative is cultivating plastic bag photobioreactors that require a low capital cost in the short term and can be a reliable method for growing microalgae. The plastic bag photobioreactor can be exposed to light and withstanding the weight of water and algae because they have the advantage of being flexible and easy to handle and can be arranged in different patterns according to their volume (BOSE et al., 2019; CHEN; NAGARAJAN; CHEAH, 2018; HUANG et al., 2017; ROMERO-VILLEGAS et al., 2018; ZHU et al., 2017).

This work aims to evaluate the productivity of low-cost photobioreactors using plastic bags, considering them as an alternative that can reduce the production cost of the microalgae *Scenedesmus* sp. The performance of these photobioreactors is compared with a plexiglass air-lift photobioreactor. To optimize the selected low-cost photobioreactor and biomass production, we evaluated the influence of UV radiation on the growth of *Scenedesmus* sp. that is absorbed by the air-lift photobioreactor.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Microalgae and culture medium

Microalgae *Scenedesmus* sp. were grown in a modified version of Guillard medium, at 23°C (STEIN, 1973). The modified medium contained two different solutions (mg.L⁻¹): a macronutrient solution: 367.6 CaCl₂·2H₂O, 369.7 MgSO₄·7H₂O, 126 NaHCO₃, 87.1 K₂HPO₄, 850.1 NaNO₃, 284.2 Na₂SiO₃·9H₂O, and a micronutrient solution: 43.6 Na₂EDTA, 31.5 FeCl₃·6H₂O, 0.1 CuSO₄·5H₂O, 0.22 ZnSO₄·7H₂O, 0.1 CoCl₂·6H₂O, 1.8 MnCl₂·4H₂O, 0.06 Na₂MoO₄·2H₂O.

Preliminary experiments have determined that the end of the exponential growth phase is on the 10th day in *Scenedesmus* sp. cultures (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014). Therefore, this was the maximum cultivation time chosen to

compare microalgae growth in different photobioreactors and with/without protection against ultraviolet radiation (UV radiation).

3.2.2 Properties of air-lift photobioreactor (plexiglass) and low-cost photobioreactor (plastic bags)

Low-cost photobioreactors (plastic bags) were compared to a plexiglass air-lift photobioreactor. The volume of culture used was 1.5 L.

The dimensions and specifications of the air-lift photobioreactor system are detailed in Gris et al. (GRIS et al., 2013). Three transparent plastic bags of different materials were selected for the low-cost photobioreactors. The size was tested considering capacity and thickness (detailed in Table 3.1).

Table 3.1. Properties of low-cost photobioreactors (plastic bags)

Photobioreactor Code	Material	Thickness [mm]	Dimensions [mm]	Light intensity losses [%]
PB 1	Polypropylene	0.018	200x290	5.0
PB 2	Polyethylene	0.056	240x325	8.7
PB 3	Polypropylene	0.024	240x325	4.3
Air-lift	Acrylic	6.0	245x350	6.6

As shown in Table 3.1 the loss of light intensity was determined for each photobioreactor, and the values obtained showed losses of less than 9%. PB 1 and PB 3 presented similar losses because they are made of the same material and have nearby thicknesses. PB 2 presented the most significant loss of light intensity.

Spectrophotometry analyses were performed on different plastic bag materials and in the plexiglass photobioreactor using a UV-vis spectrophotometer (T80+UV/VIS, PG Instruments Ltd.). The analyses were divided into two wavelength ranges: UV (200 to 400 nm) and visible (400 to 800 nm). Figure 3.1 shows that all plastic bags have low UV and visible spectrum absorbance values.

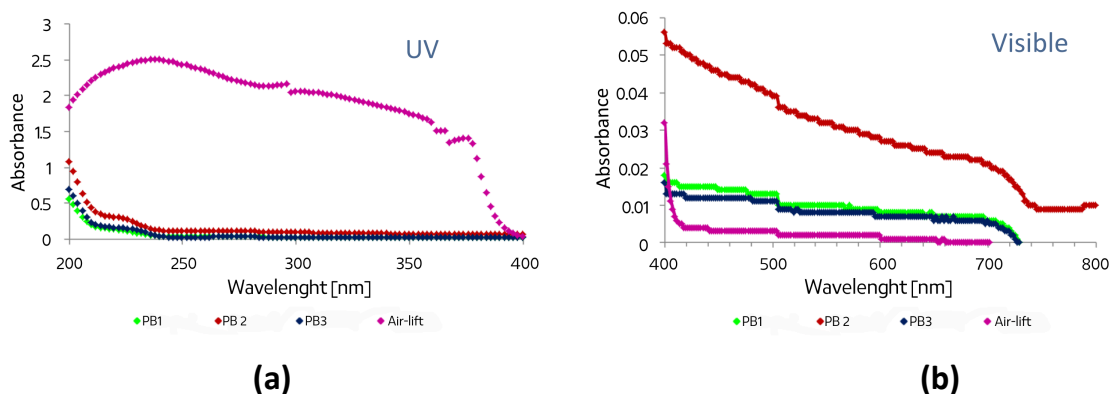


Figure 3.1. The absorption spectrum of the photobioreactors: (a) in the UV, (b) in the visible.

Figure 3.1a shows the data on UV wavelengths. The photobioreactors PB 1 and PB 3 began to absorb from wavelengths lower than 240 nm. The absorbance values in the

air-lift photobioreactor were higher than the plastic bags' absorbance values. This high absorption in the wavelengths of ultraviolet radiation causes a partial obstruction of light in the culture medium. Figure 3.1b shows the wavelength data in the visible region. Spectrophotometry analyzes show that the results are similar, in all photobioreactors, in the visible range (400 to 800 nm). Based on these data, it is necessary to analyze whether there is any effect due to the absorption of UV radiation in the cultivation of microalgae.

3.2.3 Experimental System and material properties

The system for the cultivation of *Scenedesmus* sp. in low-cost photobioreactors was assembled as shown in Figure 3.2. All the tests carried out with the plastic bags were made in triplicate. The photoperiod used in the tests was without interruption (24h light:day), and the light intensity provided was 10,000 lux ($\approx 135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Incident light intensity was measured from the light-attached surface of the photobioreactor using a lux meter (Instrutherm LD-200, Brazil). Filtered air was supplied to the culture with an aeration rate of 1.3 vvm ($\text{volume}_{\text{air}}$ per $\text{volume}_{\text{culture}}$ per minute). Cultures were maintained at a controlled temperature of 23°C.

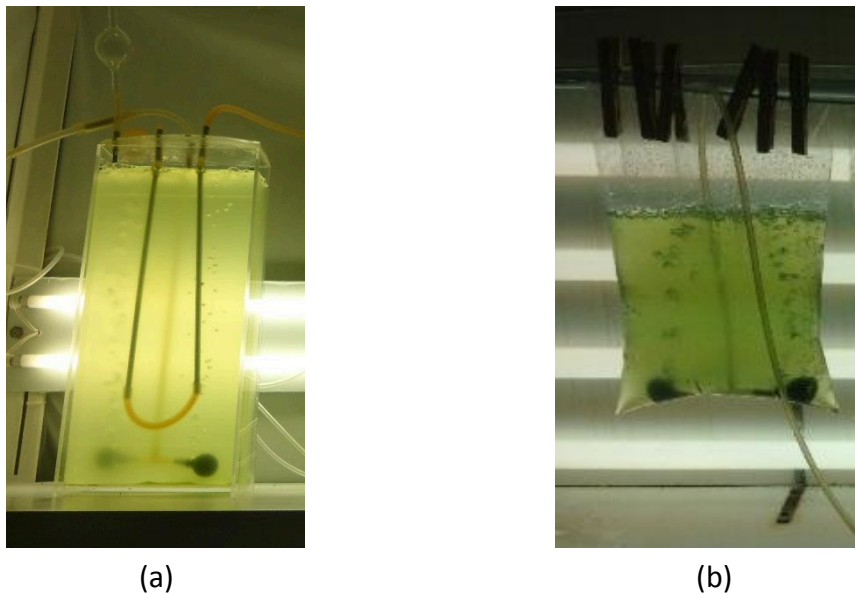


Figure 3.2. Cultivation system of *Scenedesmus* sp. in (a) air-lift photobioreactor (plexiglass) (b) low-cost photobioreactors (plastic bag).

All types of photobioreactors (low-cost and air-lift photobioreactors) were aerated through two porous stones located in the bottom-central part of each reactor, as is shown in Figure 3.2.

3.2.4 Determination of microalgae concentration

Samples for measurement of biomass content were taken aseptically using disposable sterile Pasteur pipettes in the exponential phase. The measurements were conducted once a day during all the experiments.

The microalgae growth was determined using the relationship between the dry weight and optical density measurement at a wavelength of 570 nm (OD_{570}). OD was measured daily with a spectrophotometer (UV-1600 Pro-Analysis), and the dry weight of

algal biomass was measured by filtering the samples through 0.7 μm pre-weighed membranes, which were dried at 100°C for 24 h.

The relationship between the dry weight and the OD_{570} is described by Equation 1 to compare the growth in air-lift photobioreactor and plastic bags.

$$C_{\text{biomass}} [\text{g}\cdot\text{L}^{-1}] = \text{OD}_{570} \times 0.2651 \quad (1)$$

where C_{biomass} is the biomass concentration in the culture medium and OD_{570} is the optical density measured at the wavelength of 570 nm. The correlation coefficient (R^2) was 96.2%.

We determined the biomass productivity (P_x) for each photobioreactor to compare the experiments, expressed in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, through Equation 2.

$$P_x [\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}] = (C_m - C_i) / t_m \quad (2)$$

where C_m is the maximum biomass concentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$], C_i is the initial biomass concentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$] and t_m is the cultivation time referring to the maximum concentration of biomass [day].

3.2.5 Use of UV filter in low-cost photobioreactors (plastic bags)

To verify the effect of ultraviolet radiation on the growth of *Scenedesmus* sp. it was necessary to use blocking filters of this type of radiation (donated by the company Plastisul Artefatos Plásticos Ltda.). Three different plastic filters were used, whose characteristics are described in Table 3.2.

Table 3.2. Features and specifications of UV filters

Filter code	Material	Thickness [mm]	Anti-UV	Color	Light intensity loss
Filter 1	LDPE	0.16	Yes	Transparent	11.4%
Filter 2	LDPE	0.13	Yes	Greenish	13.7%
Trifilm	LDPE	0.11	Yes	Milky/Opaque	21.2%

The anti-UV additive that protects against UV radiation used in the analyzed films consists of HALS (Hindered Amine Stabilizers). These stabilizers belong to a class of chemically reactive substances that block the free radicals created by the degradation of the carbon double bond, which is the polymer matrix, triggered by the harmful action of ultraviolet rays. In addition, it should also be noted that HALS-based light stabilizers are prone to attack by acidic chemicals. Such sensitivity requires the presence of an antioxidant added to the structure of the material to avoid any chemical problems with it (HAHLADAKIS et al., 2018).

Unlike LDPE transparent filters, Trifilm is manufactured using a triple-layer co-extrusion technique, which gives it superior quality and resistance to monolayer filters. The Trifilm light diffuser is composed of an organic additive of high action in the diffusion of light inside the greenhouses, thus increasing the diffuse solar irradiation inside.

3.2.6 Analysis of the UV filters

The spectrophotometry analyses of the material were performed in two bands of wavelength: UV (200 to 400 nm) and visible (400 to 800 nm). Ideally, the filters used during these experiments should exhibit a low loss of light intensity. In addition to this, the absorbance to the light source should be minimized in the visible range and maximized in the UV range, since we are looking for a material that acts as a blocker only in the UV range.

In Figure 3.3, it is possible to observe the absorbance of the filters at the UV and visible wavelengths. Filter 1 exhibits similar behavior to Filter 2, its only difference being the color of the filter. Trifilm, on the other hand, presents mean absorbances three times higher than those presented by filter 1 and filter 2.

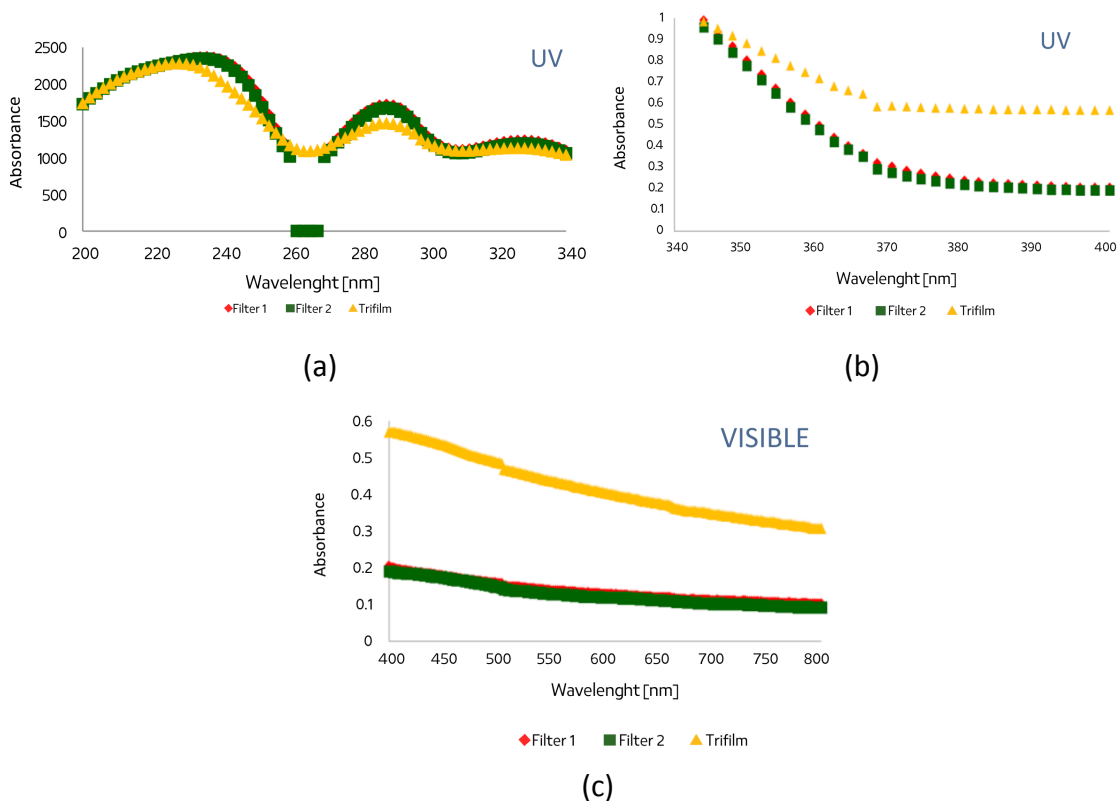


Figure 3.3. Absorption values of the UV filters for the wavelength at (a) UV radiation spectrum 200 nm to 340 nm, (b) UV radiation spectrum 340 nm to 400 nm, (c) visible spectrum: 400 nm to 800 nm.

For the spectrum band from 200 nm to 340 nm, the three filters presented similar results. They blocked all radiation for wavelengths less than 340 nm. However, filters were permeable to UV radiation fractions at wavelengths greater than 340 nm (UV-A region). Analyzing the absorption curves, it is clear that the Trifilm is not suitable for use in the experiments, because it absorbs a significant part of light at the visible range, which would harm the microalgal growth. Filter 1 and filter 2 exhibit similar behavior, and the choice of any of them would be satisfactory.

3.2.7 UV effect in the growth of microalgae

To evaluate the UV effect in the growth of microalgae, the low-cost photobioreactor PB 1 (Characteristics described in Table 1) with and without a UV filter were used. The

photoperiod was 12 h light/12 h dark to reduce energy consumption. The light intensity provided was 8000 lux ($\approx 108 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). In this case, two different calibration lines were determined: in the plastic bags without and with a UV filter.

Equation 3 relates the relationship between optical density with the concentration in plastic bag photobioreactors.

$$C_{\text{biomass}} [\text{g}\cdot\text{L}^{-1}] = \text{OD}_{570} \times 0.2828 + 0.2764 \quad R^2 = 96.3\% \quad (3)$$

3.3 Results and discussion

3.3.1 Photobioreactor selection for *Scenedesmus* sp. culture

Figure 3.4 shows the average biomass concentration in the low-cost and air-lift photobioreactors as a function of time. It is possible to observe that the biomass concentration in the low-cost photobioreactors is higher than the concentrations in the air-lift photobioreactor. PB 1 presented the best performance.

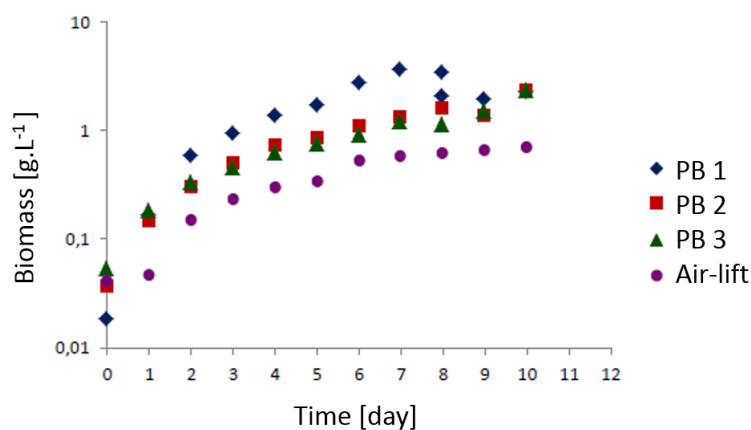


Figure 3.4. Biomass logarithmic growth curve in air-lift photobioreactor and low-cost photobioreactors (Error bars have been suppressed due to low error in the data).

The average concentrations obtained and the average productivity for each photobioreactor are shown in Table 3.3. The Tukey test was applied for differences of means for a 95% confidence level to evaluate the productivity results. The results obtained are defined by the letters (a and/or b) when means denoted by a different letter indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 3.3. Maximum concentration and productivity for each photobioreactor

Photobioreactor Code	Maximum Concentration [g.L ⁻¹]		Productivity [g.L ⁻¹ .day ⁻¹]	
	Mean	Deviation	Mean	Deviation
PB 1	3.723	0.844	0.529 ^a	0.121
PB 2	2.325	0.266	0.229 ^b	0.026
PB 3	2.356	0.498	0.230 ^b	0.050
Air-lift	0.704	-	0.066 ^b	-

Values that do not share a letter are significantly different ($p < 0,05$, Tukey's test).

It is possible to observe that the cultures carried out in PB 1 are the only ones that present productivity values significantly different from those of the air-lift, presenting better productivity and maximum concentration results.

The results obtained in this study show that it is possible to cultivate *Scenedesmus* sp. in low-cost photobioreactors. This type of reactor has generated biomass concentration and productivity values higher than the results obtained using an air-lift photobioreactor. Various researchers have used plastic bags as photobioreactors for the cultivation of microalgae such as *Nannochloropsis oceanica* (CHEN; NAGARAJAN; CHEAH, 2018), *Ikalihalophilic Eubalotheca* sp. (ZHU et al., 2017) or *Chlorella* sp. (CHEN; YAO-HSIN; HUANG, 2021) achieving values of biomass productivity between 0.01 to 0.318 g.L⁻¹.day⁻¹. These values are similar to those obtained in the present study which has achieved productivity between 0.06 and 0.526 g.L⁻¹.day⁻¹.

To explain the lower productivity in the Plexiglas Air-lift photobioreactor, we considered that the absorption of light in the UV wavelength range has been influenced. There is no consensus in the literature whether the effect of UV radiation on the most different microalgae species (EL-SHEEKH et al., 2021; LI; LIN, 2012; LIU et al., 2015). Once cultivated on an industrial scale, it is essential to search for tolerant and receptive species to this type of radiation. From the point of view of production, the microalgae's tolerance for UV radiation generates a reduction in the final cost of biomass, since it would not be necessary to use a filter to block such radiation.

According to Li and Lin (2012), ultraviolet radiation significantly influences the eutrophication of the oceans and a series of other biochemical processes related to microalgae, like inhibition of nutrient absorption and pigmentation photosynthesis and growth. They determined the need to use UV filters to grow *Scenedesmus rubescens* microalgae in open raceway ponds exposed to natural solar radiation, since experiments without the filters resulted in increased photoinhibition and decreased microalgal growth rates. The fatty acid content and profile of the microalgae studied have not changed.

In contrast, Liu et al. (2015) proved the beneficial effect of UV radiation on the microalgae *Chlorella* sp. The UV radiation caused mutagenesis in the microalgae, whose productivity and lipid accumulation increased by 7.6% and 28.1%.

Based on these considerations, it will be necessary to use UV filters in the plastic bags to evaluate this effect in *Scenedesmus* sp. cultivation.

3.3.2 Comparison of microalgae growth using UV filters

For the second part of this work, we analyze if UV radiation affects the biomass concentration in the cultures using UV filters. Filter 1 was used because it has no color (a characteristic that could generate absorption problems at specific wavelengths during the experiment).

The microalgae growth in the low-cost photobioreactor (PB 1) was evaluated for 10 days in triplicate for two situations: with and without a UV filter. The PB 1-UVF reactor refers to the low-cost photobioreactor used in the PB 1 without a UV filter, and the PB1+UVF reactor refers to the same material as PB 1 photobioreactor with a UV filter. The growth of the microalga *Scenedesmus* sp. during the experiment with the UV filter 1 (PB4+UVF photobioreactor) was evaluated for 10 days too.

Figure 3.5 relates the biomass concentration with time by comparing PB1-UVF and PB1+UVF. It is possible to observe that the maximum concentration obtained in PB1-UVF is 1.647 g.L⁻¹ and productivity 0.128 g.L⁻¹.day⁻¹. For PB4+UVF, the maximum biomass concentration obtained was 1.282 g.L⁻¹ and productivity of 0.09 g.L⁻¹.day⁻¹. The logarithmic

curve in both experiments was plotted to evaluate the microalgal growth behavior in the two case studies (Figure 3.5).

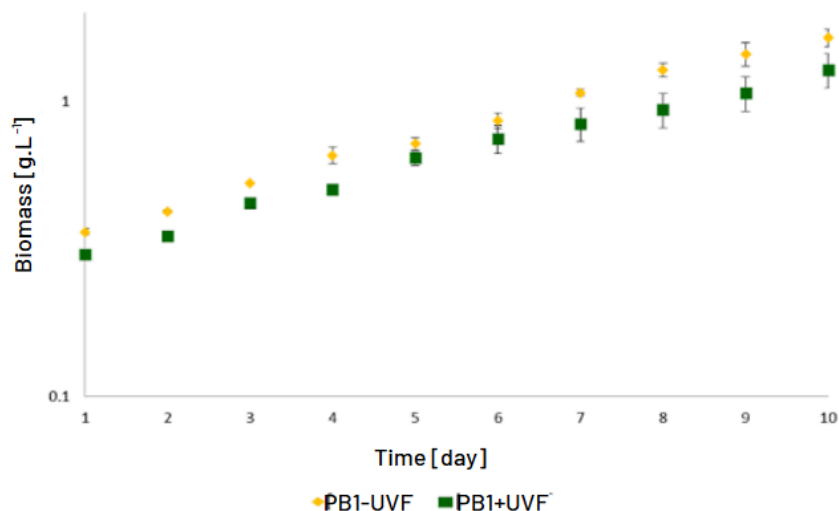


Figure 3.5. The logarithmic curve of biomass growth PB1-UVF and PB1+UVF.

As shown in Table 3.4, the experiments without UV filter (PB1-UVF) presented values superior to those with UV filter (PB1+UVF) in biomass concentration and productivity at 22% and 24%, respectively.

Table 3.4. Maximum average concentration and average productivity of experiment with and without UV filter

Photobioreactor Code	Maximum concentration [g.L ⁻¹]		Productivity [g.L ⁻¹ .day ⁻¹]	
	Mean	Deviation	Mean	Deviation
PB1 - UVF	1.647 ^a	0.109	0.128 ^c	0.014
PB1 + UVF	1.282 ^b	0.268	0.097 ^d	0.016

Values that do not share a letter are significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test).

The photoperiod applied in this second part differs substantially from that applied in the first part, which is possibly responsible for the different concentrations and productivity among the experiments, since the results obtained were significantly different by the Tukey test. It is possible to observe that the experiments performed with and without a UV filter presence showed significantly different concentration values ($p < 0.05$), proving that the microalgae *Scenedesmus* sp. cultivated in the low-cost photobioreactor yielded better productivity results and maximum concentration against UV light than under its absence.

It was expected that changes in conditions like light intensity and photoperiod cause consequent changes in microalgae growth and productivity. Abomohra et al. (2014) studied the cultivation of *Scenedesmus obliquus* cultivated in closed polyethylene plastic bags in different light intensities with a photoperiod 14:10 h light: dark. For the light intensity of $130 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, it was reported biomass productivity of $0.14 \text{ g.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ and biomass concentration of 3.11 g.L^{-1} after 22 days. For the light intensity of $100 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, it was reported biomass productivity of $0.1 \text{ g.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ and biomass concentration of 2.6 g.L^{-1} after 26 days of cultivation.

One of the possible explanations for the increase in productivity and maximum concentration would be the mutagenic effect that the UV radiation generates in the microalga *Scenedesmus* sp. Liu et al. (2015) analyzed and quantified this effect in their experiments with the microalga *Chlorella* sp., which obtained an increase of 7.6% in its productivity and 28.1% in the accumulation of lipids. Moreover, the differences observed between the first and second part of this work corroborate the results of Krzeminska et al. (2014), which show the relationship of microalgal growth with the photoperiod for the microalgae belonging to the same biological group as *Scenedesmus* sp.

Microalgae can respond to UV-induced alterations in their photosystem by preserving a dynamic balance between harm and adaptability. According to Salguero et al. (2005) marine microalgae *Dunaliella bardawil*'s photosynthetic efficiency was enhanced, and cell growth was accelerated when exposed to UV-A radiation (320–400 nm). Low and medium UV-A radiation are stress factors that, rather from being harmful to cell growth, may be used to maintain cell viability in long-term processes for large-scale carotenoid production using *Dunaliella bardawil* cultures.

ZHANG et al. (2015) showed that UV-B increase could obstruct *Dunaliella salina*'s ability to absorb light. For this reason, they adjusted UV-B dosages. It appeared that UV-B radiation treatment at all doses assayed stimulated the pigment content of *Dunaliella salina*, and high UV-B doses provoked an increase during the initial stage of exposure, whereas a decline was observed with prolonged exposure. This finding suggests that microalgae might adapt to UV exposure.

3.4 Conclusions

It is possible to use low-cost photobioreactors using plastic bags for *Scenedesmus* sp. production. Microalgae cultivated in plastic bags showed higher productivity when compared to the air-lift photobioreactor because cultivation in plastic bags enables UV light. Productivity between the plastic bags used showed that in PB1, the concentration and productivity were higher than in the photobioreactors PB2 and PB3.

By employing UV filters in the plastic bags, the impact of UV radiation could be verified. The experiments without UV filters showed higher values than those with UV filters in terms of average maximum concentration (22% higher) and productivity (24% higher). We conclude that UV light is responsible for the difference in growth behavior of the microalga *Scenedesmus* sp. in the low-cost photobioreactor evaluated.

Capítulo 4 - Comparison of dissolved air flotation and sedimentation for harvesting of *Scenedesmus* sp cultivated in ethanol vinasse

Abstract: Bioremediation of sugarcane vinasse using microalgae is an alternative that generates an effluent with a low concentration of BOD, nitrogen, and phosphorus. This work assessed the harvesting efficiency of microalgae biomass cultivated in vinasse using Tanfloc SL as vegetable-tannin organic flocculant followed by dissolved air flotation (DAF) and compared it with sedimentation. DAF showed harvest efficiency up to 85%, and sedimentation harvest efficiency showed values up to 99%. The best results, using sedimentation, show that the culture medium with 20% in vinasse requires conditions 180 mg.g⁻¹ flocculant, and pH 6.7 for 99.95% efficiency (agitation value within the range of 100 to 200 rpm); and the culture medium containing 40% vinasse requires conditions of 150 rpm, 187.5 mg.g⁻¹ flocculant, and pH 4.6, resulting in 99.58% of microalgae recovery.

Keywords: vinasse, microalgae, *Scenedesmus* sp, harvesting, sedimentation.

4.1 Introduction

Microalgae have been used in different ways around the world. Due to its high lipid and carbohydrate content, microalgae can be considered an excellent raw material for the production of biofuels, pigments, and food supplements (BÉLIGON et al., 2016; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2014). However, the cost of producing microalgae biomass still seems expensive for use as fuel. As a result, the cost of the entire production line must be significantly reduced. To minimize costs, an initiative is the use of industrial effluents and sewage (ALI et al., 2021; RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014). Wastewater has nutrients that can be used as substrates for microalgae cultivation allowing to combine cultivation with the treatment of various wastewater sources. Different wastewater sources contain nutrients such as nitrogen and phosphorus that can be used as a substrate for the production of microalgae and, at the same time, cultivated microalgae can generate treated effluents. Şirin and Sillanpää (2015) evaluated the growth of *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater, achieving phosphorous and nitrogen removal of up to 90% and 86% respectively. Lima et al. (2020) looked at the growth of 4 microalgae species (*N. aditana*, *C. sorokiniana*, *Chlorella* sp., and *Dunaliella tertiolecta*) in the bioremediation of municipal wastewater, concluding that *Chlorella* showed the best results with 77% nitrogen removal. Previous studies have shown that microalgae *Scenedesmus* sp. can grow in cultures containing up to 40% of sugarcane vinasse, an industrial effluent that requires treatment, with removal values of almost 100% of nitrogen and phosphorus (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014).

Biomass harvesting, which is also important, represents between 20% and 30% of total production costs (apud NIAGHI; A. MAHDAVI; GHESHLAGHI, 2015). It requires one or more phases of solid-liquid separation that involve a biomass concentration that can be utilized later. Typical processes include sedimentation, flotation, centrifugation, filtration, and electrophoresis, some of which require a lot of energy (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016; NIAGHI; A. MAHDAVI; GHESHLAGHI, 2015; REYES; LABRA, 2016; SHAIKH et al., 2021). A promising alternative is a collection, i.e., by flocculation, followed by separation. This alternative offers significant economic potential for several processes and is technically viable for microalgae (GARG; WANG; SCHENK, 2014; MILLEDGE; HEAVEN, 2013; NDIKUBWIMANA et al., 2016).

Flocculation can be achieved using chemical flocculant (ferric chloride, chitosan, and alkaline flocculation) or using physical flocculation (ultrasound, electro-flocculation, and magnetic separation). However, results depend on the type of microalgae cultivated and cannot be directly extrapolated to many species or strains (GERARDO et al., 2015; LAMA et al., 2016; VANDAMME; FOUBERT; MUYLEAERT, 2013). Yang et al. (2021) explain that when an inorganic flocculant is used, it is difficult to remove residual Fe or Al in the treated water, so it is necessary to use a non-toxic flocculant that can flocculate effectively in a wide pH range. Vegetable-tannin flocculant is a modified product from *Acacia mearnsii* used as an alternative for the flocculation of microalgae biomass. It is made from tannin by adding amino groups (MANGRICH et al., 2014). It has received intense research attention due to its efficiency as an ideal natural flocculant for microalgae harvesting and low cost. The harvesting process using this flocculant does not affect cell viability or lead to the loss of cell extractions including lipids, carbohydrates, and protein (YANG; HOU; MIAO, 2021).

In this study, the harvesting efficiencies of Dissolved Air Flotation (DAF) and sedimentation were evaluated. The efficiencies of both methods were compared using *Scenedesmus* sp microalgae biomass cultivated in different culture media varying the

percentage of sugarcane vinasse in the culture medium. In addition, operating parameters were analyzed: pH, agitation, and flocculant concentration, to determine the best harvest conditions for each method.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Culture medium

The microalgal strain *Scenedesmus* sp. used in this work was cultivated at GIMSCOP (Group of intensification, modeling, simulation, control, and optimization of processes) at Federal University of Rio Grande do Sul. Previous experiments showed that it was possible to grow *Scenedesmus* sp. in vinasse, with percentages up to 40% (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014). The culture medium used was Modified Guillard medium (MG medium) pure or mixed with vinasse in 20% and 40%. Modified Guillard consists of two solutions: macronutrient and micronutrient, described in Ramirez et al. (2014). From each of these solutions, doses of 10 ml per liter of culture were used in photobioreactors. The modified medium does not contain vitamins that are present in the original Guillard medium (STEIN, 1973). The vinasse used was provided by Coopercana Ltda. located in Porto Xavier in the State of Rio Grande do Sul (Southern Brazil). Having the following characteristics: pH 4, BOD 7410 mg.L⁻¹, total nitrogen 245.51 mg.L⁻¹, total phosphorus 24.5 mg.L⁻¹, calcium 89.18 mg.L⁻¹, potassium 557.57 mg.L⁻¹.

4.2.2 Photobioreactors system

Six photobioreactors were assembled with approximately 5 liters each for DAF tests and another six for sedimentation tests. They were kept at room temperature (20°C). The medium was exposed to a light intensity of 10,000 lux ($\approx 135 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) without interruption and was aerated through two porous stones located in the bottom-central part of each photobioreactor with aeration of 1 L.min⁻¹. Photobioreactors with a 15.5 cm diameter and 28.3 cm height were used (Figure 4.1).

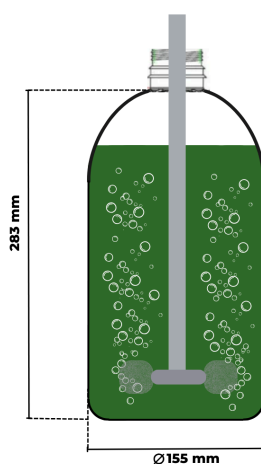


Figure 4.1. Photobioreactor dimensions and aeration system layout.

4.2.3 Biomass concentration measurement

The biomass concentration (C_{biomass}) was determined by optical density measurements at the wavelength 570 nm ($\text{OD}_{570\text{nm}}$) using a spectrophotometer (UV-1600, Pro-analysis). Absorbance values were converted to biomass concentration according to Equation 1.

$$C_{\text{biomass}} [\text{g.L}^{-1}] = 0.406 * \text{OD}_{570\text{nm}} - 0.011 \quad R^2=0,91 \quad (1)$$

In Figure 4.2, biomass growth is shown, with the harvest point set at a biomass concentration of 0.5 g/L, which was defined as the target value to enable subsequent work. It is noted that on the tenth day, cultures without any vinasse content were harvested for the experimental design. Cultures with 20% vinasse content were harvested on the sixteenth day, while cultures with 40% vinasse content were harvested on the seventeenth day.

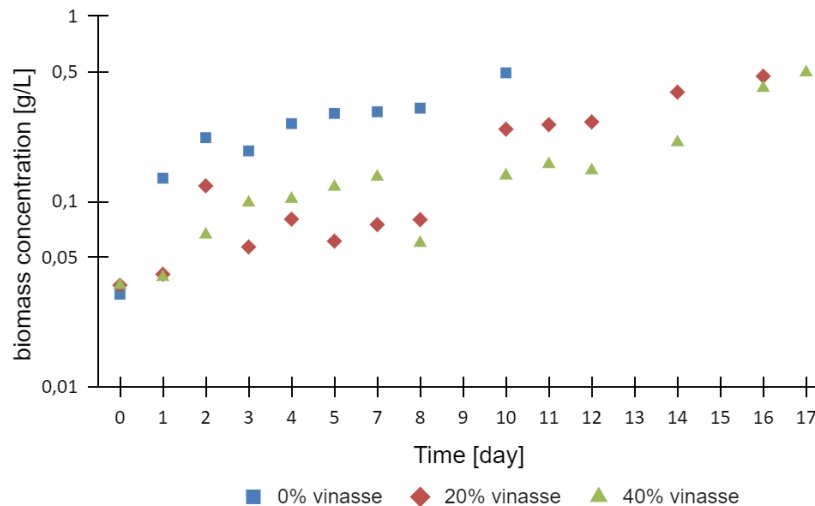


Figure 4.2. Biomass logarithmic growth curve in culture medium with 0%, 20% or 40% vinasse content.

4.2.4 Microalgae growth in vinasse

Photobioreactors were arranged using three combinations of culture medium: 0%, 20% or 40% vinasse content, the remaining content was filled with Modified Guillard medium.

4.2.5 Flocculation process

For flocculation, Tanfloc SL, a vegetable-tannin flocculant, from TANAC was used (Montenegro, Brazil). Preliminary tests showed that Tanfloc SL is efficient for harvesting *Scenedesmus* sp. Flocculation was combined with flotation or sedimentation for greater microalgae harvesting efficiency. The experiments were carried out using samples of 500 mL of microalgae cultivated in 0%, 20%, or 40% of vinasse culture. It was defined that samples are collected when the optical density of the microalgae culture is approximately 1. A laboratory equipment model Milan JTC (Figure 4.3a) was used, which has a mechanical agitation system to prepare three samples at the same time. The procedure applied in all cases involved 3 steps: (1) Rapid mixing after addition of flocculant to the algal culture for 3 min, being necessary to adjust: flocculant concentration, pH, and agitation speed (according to values defined in Table 1) (2) slow agitation at 35 rpm during 5 minutes for effective floc formation and (3) application of DAF or sedimentation process.

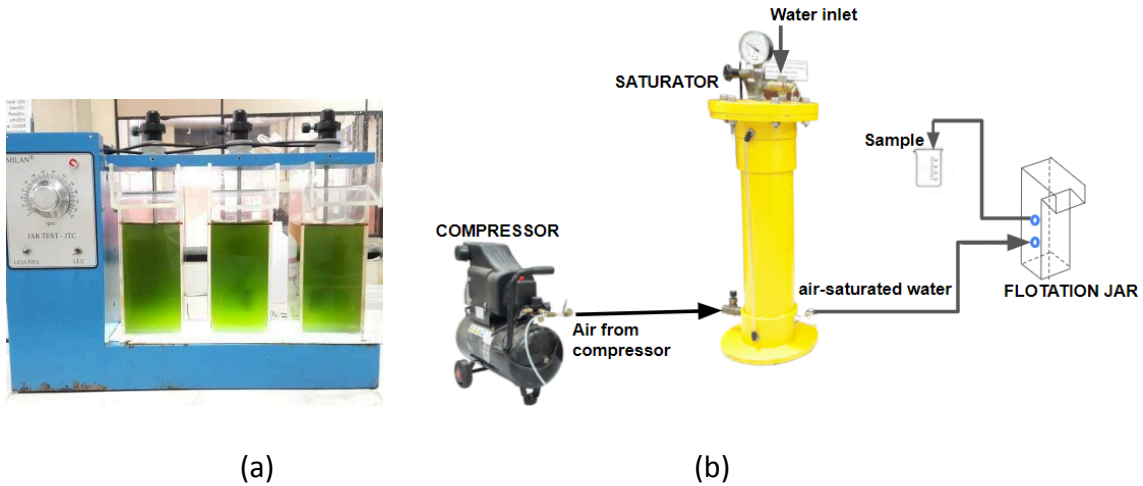


Figure 4.3. (a) Jar test equipment laboratory (model Milan JTC), (b) Schematic representation of DAF system.

4.2.6 Dissolved air flotation process

For flotation tests, a schematic representation of the DAF system is shown in Figure 4.3b. The apparatus consisted of a compressor, a saturator, and a flotation jar (capacity: approx. 650 mL) with an inlet point for air-saturated water and an outlet point for taking samples.

Saturator has an effective volume of 3L, it was filled with distilled water, then water was saturated with air at a pressure of approximately $2.9 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$. After the saturation period, the jars containing the cultures with flocculant were coupled to the saturator and, through the opening of the valve, the air-saturated water was released, causing the flocs to rise and separate the microalgae from the liquid of the culture media. The volume of pressurized liquid injected into each flotation jar was approximately 150 mL, corresponding to 30% of the culture volume used in each assay.

To calculate the percentage harvesting efficiency for DAF (Dissolved Air Flotation), equation 2 which relates the optical density at 570 nm and the volume contained in each jar before and after the combined process of flocculation and flotation was used.

$$\text{Harvesting efficiency}[\%] = (\text{OD}_{\text{initial}} - \text{CF} * \text{OD}_{\text{final}}) / \text{OD}_{\text{initial}} * 100 \quad (2)$$

Using values of optical density at 570 nm, $\text{OD}_{\text{initial}}$ is the initial absorbance of the microalga culture, OD_{final} is the final value after the flotation process and, CF is the correction factor used to compensate for the OD reduction due to dilution of the water added.

To calculate the Correction Factor (CF) we use Equation 3.

$$\text{CF} = (V_{\text{initial}} + V_{\text{inlet}}) / V_{\text{initial}} \quad (3)$$

Where V_{inlet} is the volume of air-saturated water added, and V_{initial} is the initial volume of microalgae culture.

4.2.7 Sedimentation process

For sedimentation, different 500 mL samples of algal culture were mixed in the Jar Test equipment following the steps detailed in the flocculation process. After flocculation, according to step 2, gentle mixing was carried out for 5 min to facilitate the formation of

flocs and minimize the breaking of agglomerates; then we let the flocs settle by gravity during 2 minutes (step 3).

Harvesting efficiency for sedimentation measured in percentage-based was calculated by Equation 4.

$$\text{Harvesting efficiency}[\%] = (\text{OD}_{\text{initial}} - \text{OD}_{\text{final}}) / \text{OD}_{\text{initial}} * 100 \quad (4)$$

Where $\text{OD}_{\text{initial}}$ is the initial absorbance of the microalga culture and OD_{final} is the final value after the sedimentation process.

4.2.8 Experimental designs

Three experimental designs were conducted to determine the best separation conditions by DAF (Dissolved Air Flotation) in different vinasse percentage concentrations present in the culture medium: without vinasse, with 20% vinasse, and 40% vinasse. Subsequently, other three experimental designs were conducted to determine the best conditions for separation by sedimentation with the same percentage of vinasse content in the culture medium (0%, 20%, and 40% vinasse). The experimental data were processed using the Statistica 13 software. Each Central Composite Design (CCD) was carried out to determine the optimal recovery efficiency of the microalgae harvest and see if the variables' behavior is significant for each culture. To choose the variables, it must be taken into consideration that it is necessary to know the effect of the flocculant dose in these processes, if the pH influences the efficient recovery of biomass (CASTRILLO et al., 2013), and if the agitation speed influences the behavior of the flocculant distribution, as it must be evenly distributed throughout the suspension. Therefore, the variables of interest were: agitation in the coagulation process (x_1), pH (x_2), and flocculant concentration (x_3). The ranges and levels of the variables are reported in Table 4.1.

Table 4.1. Values defined by CCD for *Scenedesmus* sp cultivated in Guillard Modified Medium without vinasse, medium with 20% in vinasse and medium with 40% in vinasse

Variables	Code	Level				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Agitation [rpm]	x_1	100	120	150	180	200
pH [-]	x_2	4	5.4	7.5	9.6	11
Flocculant concentration [mg.g^{-1}]	x_3	50	80.4	125	169.6	200

As shown in Table 4.1, the central point set for each CCD was 150 rpm, pH 7.5, and 150 mg.g^{-1} flocculant - biomass. Regression analysis and analysis of variance (ANOVA) were performed to fit the models and examine the statistical significance of the model terms. In addition, response surfaces were generated with the help of the commercial statistical package Statistic 13. Factors are considered significant when $p < 0.05$.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Central Composite Design 1 (CCD1): Without vinasse

Initially, an evaluation of variables in microalgae cultivated in Guillard modified medium without vinasse was carried out in order to determine the best conditions and

later compared to treatments with vinasse. Through analysis of variance of data obtained in different conditions, whose ranges set out are shown in Table 1, it was found that the pH was the most significant variable ($p < 0.00003$) after the concentration of tannin flocculant ($p < 0.006$), and agitation ($p < 0.023$), showing that these variables influence the harvesting efficiency. The agitation-pH and pH-concentration interactions were significant ($p < 0.01$). The lack of adjustment does not seem significant.

Considering only the significant effects, the coefficient of determination (R^2) is equal to 90.3%. The reduced model, which shows the harvesting efficiency for DAF as a function of the agitation (x_1), pH (x_2), and concentration (x_3) in the studied range, is given by Equation 5.

$$\text{Harvesting efficiency [\%]} = 95.8 - 0.759 x_1 - 2.237 x_2 + 1.452 x_3 - 4.918 x_1 * x_2 + 4.078 x_2 * x_3 \quad (5)$$

The response surface shown in Figure 4.4a and Figure 4.4b is based on the model of equation 5, which shows the behavior of the agitation, pH, and concentration after the DAF method.

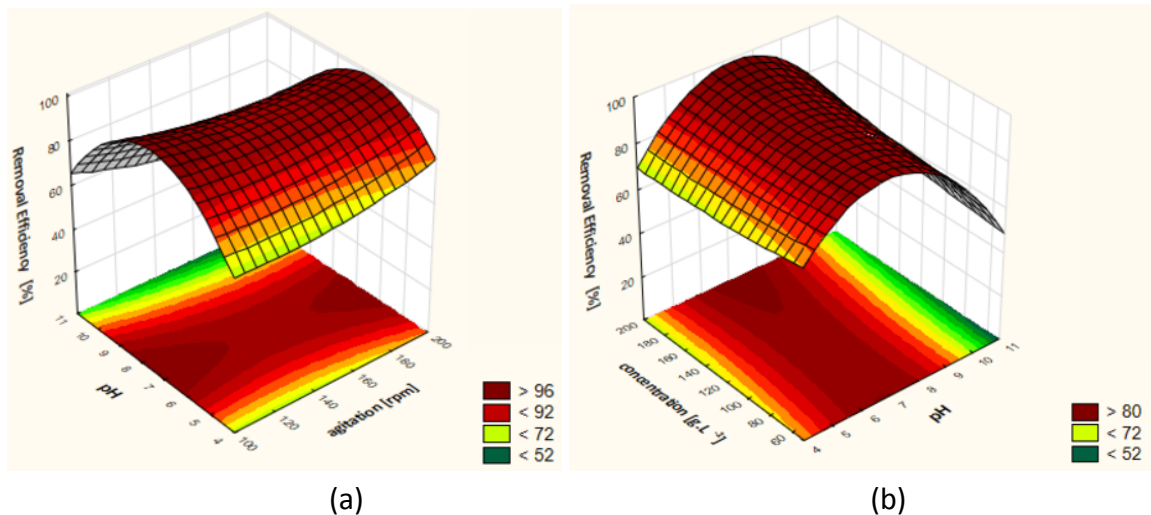


Figure 4.4. CCD 1 (0% vinasse) for DAF: Response surface for *Scenedesmus* sp. harvesting efficiency - CCD1 for DAF (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH-flocculant concentration - harvesting efficiency.

Based on the response surfaces (Figure 4.4), the recommended operating conditions are agitation less than 130 rpm and greater than 180 rpm, pH between 6 and 8, and flocculant concentration greater than 152 mg.g^{-1} . Equation 5 suggests an optimal point at pH 6.7, agitation of 200 rpm, and a concentration of 200 mg.g^{-1} to achieve a removal efficiency of 99.48%.

For the experimental design with sedimentation, we used the same conditions: *Scenedesmus* sp. cultivated in MG medium without vinasse addition. Different values of harvesting efficiency of microalgae were calculated from a Central Composite Design (CCD1) for sedimentation based on the values defined in Table 1. It was found that the pH (linear and quadratic) was the most significant variable (linear $p < 0.0013$ and quadratic $p < 0.0003$), agitation - pH interaction ($p < 0.0069$), and agitation - tannin flocculant concentration interaction ($p < 0.023$), showing that these variables influence the harvesting efficiency. Considering only the significant effects, the coefficient of determination (R^2) is equal to 96.3%. The adjusted parametric model, that shows the harvesting efficiency as a function of the agitation (x_1), pH (x_2), and concentration (x_3) in the studied range, is given by Equation 6.

$$\text{Harvesting efficiency}[\%] = 97.77 - 4.056 x_2 - 9.029 x_2^2 - 2.287 x_1 * x_2 - 1.819 x_2 * x_3 \quad (6)$$

Thus, the best harvest point for sedimentation using equation 6 was under conditions of 200 rpm, pH 6.7, and Tanfloc SL concentration of 156 mg.g⁻¹ biomass yielding an efficiency of removing 99.99%.

The response surface shown in Figure 4.5a and Figure 4.5b is based on the model of Equation 6. It shows the behavior of agitation, pH, and concentration using sedimentation.

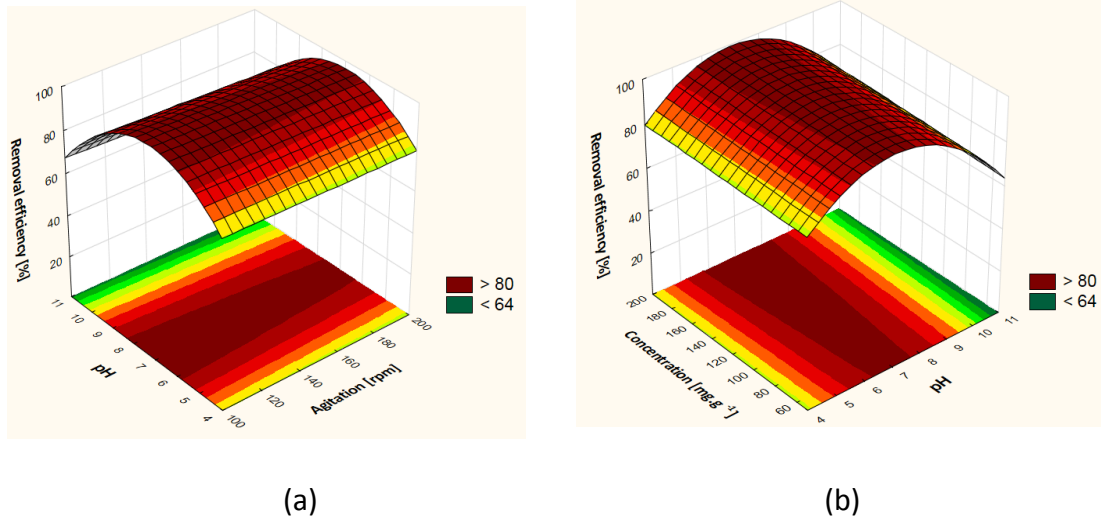


Figure 4.5. CCD1 (0% vinasse) for sedimentation: Response surface for *Scenedesmus* sp. harvesting efficiency - CCD1 for DAF (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency

4.3.2 Central Composite Design 2 (CCD2): Experiments with 20% vinasse

The second part of the experiments was carried out for *Scenedesmus* sp in culture with 20% of vinasse. For DAF, it was found that the concentration of tannin flocculant and pH were considered statistically significant, while the agitation variable had no significant effect within the range studied. The model presented R² equal to 97.6%. The model obtained for the harvesting efficiency for DAF, as a function of the pH (x₂), and concentration of flocculant (x₃), in the range established in Table 1, is given by Equation 7.

$$\text{Harvesting efficiency}[\%] = 94.36 - 9.49 x_2 - 11.34 x_2^2 + 2.54 x_3 \quad (7)$$

Based on Equation 7, the optimal conditions predicted for Dissolved Air Flotation (DAF) in a culture with 20% vinasse were achieved with agitation exceeding 160 rpm, a pH of 6.5, and a flocculant concentration greater than 125 mg/g, resulting in a 99.83% harvesting efficiency.

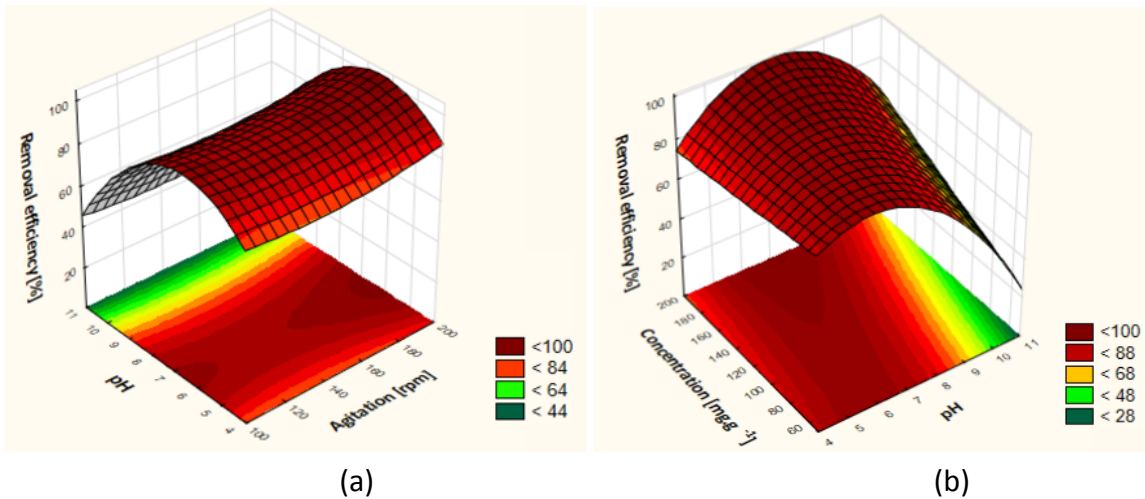


Figure 4.6. CCD2 (20% vinasse) for DAF: Response surface for *Scenedesmus* sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH- flocculant concentration - harvesting efficiency.

For sedimentation, using an Analysis of Variance (ANOVA), it was found that the pH (linear and quadratic) was the most significant variable (linear/quadratic $p < 0.000021$), and pH- flocculant concentration interaction ($p < 0.00131$).

The parametric model obtained for the harvesting efficiency using sedimentation, in the function of the pH (x_2), and concentration of flocculant (x_3), in the range established in Table 1, is given by Equation 8 and presented R^2 equal to 98.2%.

$$\text{Harvesting efficiency} [\%] = 98.25 - 5.667 x_2 - 6.0329 x_2^2 + 0.929 x_2 * x_3 \quad (8)$$

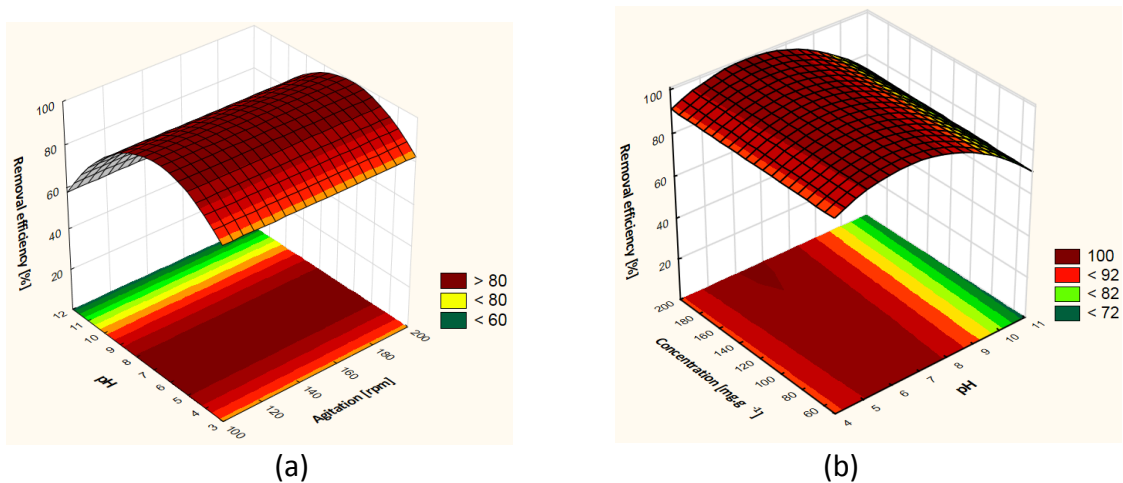


Figure 4.7. CCD2 (20% vinasse) for sedimentation: Response surface for *Scenedesmus* sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency

The optimal harvest point for sedimentation, as indicated by Equation 8, was achieved under conditions with any agitation value within the range of 100 to 200 rpm, a pH of 6.7, and a flocculant concentration less than 180 mg.g^{-1} , resulting in a removal efficiency of 99.95%.

From the response surfaces, it can be seen that for DAF the pH must be between 4 - 8 and the flocculant concentration must be greater than 125 mg.g^{-1} (Figure 4.6a and Figure

4.6b); for sedimentation, it is possible to work with a pH between 5 and 8 (Figure 4.7a and Figure 4.7b).

4.3.3 Central Composite Design 3 (CCD3): Experiments containing 40% vinasse

The last experiments were carried out under conditions for microalgae cultivation in a medium with 40% of vinasse. For DAF, the three variables were significant. R^2 is equal to 98.6% and the model for harvesting efficiency of DAF as a function of agitation (x_1), pH (x_2) and concentration (x_3) in the range studied, is defined by Equation 9.

$$\begin{aligned} \text{Harvesting efficiency [\%]} = & 79.11 - 2.52 x_1 - 3.89 x_1^2 - 4.57 x_2 - 8.56 x_2^2 \\ & + 10.93 x_3 - 6.9 x_3^2 - 1.03 x_1 * x_2 - 2.72 x_2 * x_3 \end{aligned} \quad (9)$$

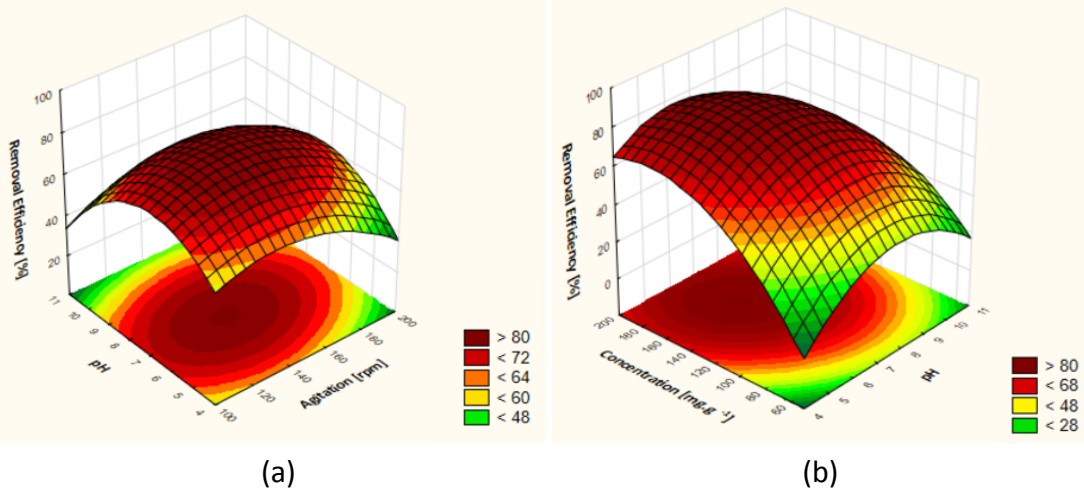


Figure 4.8. CCD3 (40% vinasse) for DAF: Response surface for *Scenedesmus* sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency.

Figure 4.8a and Figure 4.8b show the response surfaces for DAF, it is observed that the best results (>77%) can be obtained under pH 6, agitation range between 120 and 170 rpm, and flocculant concentration between 130 and 200 mg.g^{-1} . The best result of harvesting efficiency for DAF using equation 9 was 85.08%, obtained with the condition of 141 rpm, pH 6.7, and flocculant concentration of 156.3 mg.g^{-1} biomass.

For sedimentation, through analysis of variance, it was found that significant variables are: agitation ($p < 0.0018$), pH (linear $p < 0.000046$ and quadratic $p < 0.0018$), flocculant concentration (linear $p < 0.000008$ and quadratic $p < 0.00077$), and pH-concentration interaction ($p < 0.0139$). Considering only the significant effects, the coefficient of determination (R^2) is equal to 91.3%. The reduced parametric model for the harvesting efficiency is given by Equation 10.

$$\begin{aligned} \text{Harvesting efficiency [\%]} = & 93.96 - 2.134 x_1^2 - 3.525 x_2 - 2.13 x_2^2 \\ & + 4.565 x_3 - 2.468 x_3^2 - 1.689 x_2 * x_3 \end{aligned} \quad (10)$$

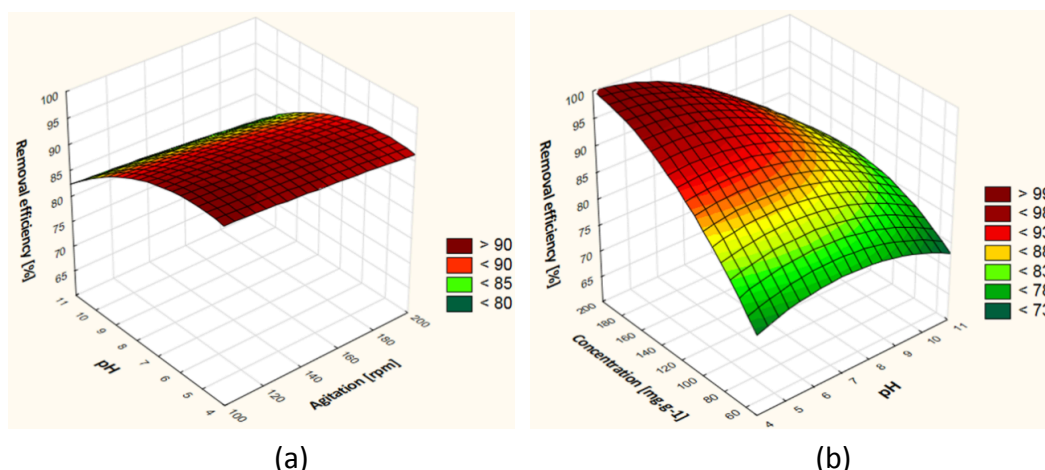


Figure 4.9. CCD3 (40% vinasse) for sedimentation: Response surface for *Scenedesmus* sp. harvesting efficiency (a) agitation - pH - harvesting efficiency (b) pH - flocculant concentration - harvesting efficiency.

Figure 4.9a and figure 4.9b show that harvesting efficiency for sedimentation can be superior to 90% operating within a pH range of 4 to 7.5, agitation in a range of 120 - 180 rpm, and concentration of flocculant between 125 and 200 mg.g⁻¹. The optimal harvest point for sedimentation, as predicted by Equation 10, can be achieved under conditions of 150 rpm, a pH of 4.6, and a flocculant concentration of 187.5 mg/g, resulting in a removal efficiency of 99.58%.

The results of the experiments with sedimentation and DAF show that the harvesting efficiency depends on the vinasse concentration added to the medium. In the case of cultivation in Medium Guillard modified, the best results are >99%, in the culture of 20% vinasse it is >99%, and in the culture of 40% vinasse the best results are between >85%. Showing that DAF and sedimentation can be used as separation processes. However, sedimentation showed higher value compared to DAF efficiency value for culture of 40% of vinasse. In all the cases, response surface analysis was used for the data generated after the experiments to understand the effect of input variables on pH, flocculant concentration, and agitation with the help of polynomial models. The result of the regression analysis and analysis of variance (ANOVA) shows that pH had a significant effect on harvesting efficiency in all the cases. For DAF and sedimentation, neutral pH has a positive effect on the harvesting efficiency in CCD1 and CCD2. In CCD3, pH acid improved the harvesting efficiency for sedimentation. The agitation had no effect, only the interaction with concentration influences in CCD1-flotation. The tannin flocculant works when it contains more than 100 mg.g⁻¹. At better conditions, harvesting efficiency by sedimentation showed values where CCD1 was 99.99%, CCD2 was 99.95% and CCD3 was 99.58%. Similar harvesting efficiencies were obtained by Wolf et al. (2015), wastewater was treated using 20 mg.L⁻¹ Tanfloc SG in effluent from a dairy industry with harvesting >90%. Kong et al. (2020) cultivated *Scenedesmus* sp in BG-11 medium and used flocculation with different metal ions followed by sedimentation, achieving a sedimentation efficiency of 91.2%. Leite et al. (2019) studied *Chlorella sorokiniana* cultivated in wastewater pretreated and used coagulation followed by DAF achieving efficiency between 94% and 98%.

4.4 Conclusions

Experimental designs developed in this work show that sedimentation and flotation can be used for the harvesting of *Scenedesmus* sp. cultivated in up to 40% vinasse in a

culture medium. The pH was a variable that influences significantly in all cases. Comparing harvesting efficiency, it is possible to consider flocculation with Tanfloc SL (vegetable-tannin flocculant) and sedimentation as an optimal separation method showing harvesting recovery values greater than 99%. Using Tanfloc SL and DAF, the harvesting efficiencies were greater than 85%. Both methods were demonstrated to be efficient for the recovery of biomass and to generate a treated effluent.

Capítulo 5 - Rapid quantification of lipids in microalgae *Scenedesmus* sp. using fluorescence

Abstract: Lipids extracted from microalgae for biofuel production have drawn the attention of researchers. Various methods for quantification of neutral lipids, such as solvent extraction or gravimetric, require a large volume of sample and are time-consuming. In this work, Nile Red was employed to evaluate the lipid content in microalgae *Scenedesmus* sp. through 2D fluorescence spectroscopy using chemometric modeling with a selection of wavelength pairs reducing the variable numbers. Cultivation of microalgae for 10 days was performed. Samples were taken starting after the 5th day of cultivation. Samples of microalgae were dried using an oven with tangential airflow and the conventional Bligh and Dyer method for lipid extraction was employed. Before the measurement of fluorescence, the samples were diluted in ethanol at 40°C for 10 minutes, and then Nile Red solution (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ethanol) was added. The results of lipid quantification using the proposed technique achieved mean absolute percentage error (MAPE) lower than 5% and correlation coefficients around 0.99 in the test phase. Linear models using four excitation-emission pairs of fluorescence were fitted and were selected based on Pure Spectral Chemometric Modelling (PSCM). The method for lipid quantification using predictive linear models and 2D fluorescence proved to be robust and fast (requiring less than 30 min) compared to the conventional gravimetric method (which takes at least 5 hours) to obtain comparable results.

Keywords: lipids; microalgae; *Scenedesmus* sp.; Nile Red; ant colony optimization.

5.1 Introduction

Microalgae are studied as a possible raw material for biofuels production due to their rapid growth and the ability to accumulate neutral lipids that can be converted into biodiesel. In their composition, microalgae contain carbohydrates, proteins, lipids,

and fatty acids (MATOS, 2021). Previous studies have produced biodiesel from algal lipids that had similar properties to those of fossil diesel or other common biodiesel (BATISTA et al., 2018).

Finding the proper time for extracting lipids from a culture is an important point for process optimization, and it is necessary to monitor the evolution of the concentration of the lipids during the cultivation. There are several methods to determine the lipid content in microalgae. Some of these methods are thin-layer chromatography (TLC), Liquid chromatography (HPLC-MS), gas chromatography (GC-MS), and gravimetric (YAO et al., 2015). The most common method is gravimetric extraction, which consists of using solvents such as hexane or chloroform and a known amount of dry biomass. The biggest disadvantage of this method is the necessity of using relatively large quantities of samples and reagents. Furthermore, it requires time for the drying and extraction processes (PATEL et al., 2019). The efficiency of lipid content quantification from microalgae depends on the species and the method utilized. Thus, it is necessary to evaluate a faster alternative to measure lipids that requires small amounts of sample and employs less hazardous solvents.

An alternative could be to use a faster and less aggressive method, such as fluorescence spectroscopy. Two-dimensional fluorescence spectroscopy opens the opportunity to measure biological systems (microorganisms and chemical metabolites). Recently, fluorescence spectroscopy has become one of the preferred methods for monitoring bioprocesses that can easily be implemented for lipid quantification.

The fluorescence spectroscopy may require the use of a fluorescent marker to quantify the lipid content in situ. The marking technique employing spectrofluorescence consists of placing a dye solution in the sample taken from the microalgae culture, where the mixture stays in contact for the adequate time for the dye to cross the cell wall of the microalgae, creating a dye/lipid interaction that can be analyzed by fluorescence spectroscopy. Commercially available dyes having these characteristics are Nile Red and BODIPY 505/515 (ALEMÁN-NAVA et al., 2016; HOUNSLOW et al., 2017; PATEL et al., 2019; YAO et al., 2015).

The Nile Red (9-diethylamino- 5H-benzo[α]-phenoxazin-5-one) has been widely applied as a marker for lipids (GUSBETH et al., 2016; RUMIN et al., 2015). Nile Red can be used as a selective probe for neutral lipids by properly selecting the excitation and emission wavelengths or using data-driven chemometric modeling techniques (BALDUYCK et al., 2015; NATUNEN et al., 2015; REN et al., 2015; ROSTRON; LAWRENCE, 2017). Although the Nile Red method has been frequently used to determine the lipid content of various species, the excitation and emission wavelengths vary considerably for different microalgae (see Table 5.1).

Table 5.1. Excitation/Emission wavelengths used in different microalgae lipid determination using Nile Red

Microalgae	Excitation [nm]	Emission [nm]
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	530	575
<i>Botryococcus braunii</i>	480	580
<i>Dunaliella</i>	480	590
<i>Scenedesmus sp.</i>	530	568

Adapted from Ren et al. (2015)

Table 5.1 shows that previous studies worked with only one pair of excitation/emission wavelengths to predict the lipid content in a culture. However, the relationship between lipid content and fluorescence data reached a coefficient of determination of 0.85, which does not provide a reliable and accurate adjustment. In the case of the *Scenedesmus* sp. it must be verified if an Ex/Em pair is enough to predict lipid concentration, otherwise, it is necessary to use a multi-wavelength spectrofluorometer and chemometric models.

Biological applications have already been carried out, and it has been possible to determine the relationship between the fluorescence data and the process variables to be measured (WANG et al., 2019). Among the chemometric modeling techniques that are generally applied in data processing, it can be mentioned the techniques of partial least squares (PLS), principal component regression (PCR), principal component analysis (PCA), and neural networks (COSTA et al., 2020; NOLL; HENKEL, 2020; RANZAN et al., 2022; SÁ et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2015).

The aim of this study is to propose and evaluate the feasibility of a methodology for lipids quantification from microalgae *Scenedesmus* sp. based on fluorescence spectroscopy measurements, which is fast and uses samples of negligible volume samples, i.e. only 1 mL.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Microalgae strain and culture conditions

The microalgae *Scenedesmus* sp. was cultivated in Guillard modified culture medium (STEIN, 1973). The culture medium contains two different solutions described in Table 5.2.

Table 5.2. Guillard Modified culture medium

Solution	Component	[mg.L ⁻¹]
Macronutrient	CaCl ₂ .2H ₂ O	367.6
	MgSO ₄ .7H ₂ O	369.7
	NaHCO ₃	126
	K ₂ HPO ₄	87.1
	NaNO ₃	850.1
	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	284.2
Micronutrient	Na ₂ EDTA	43.6
	FeCl ₃ .6H ₂ O	31.5
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.8
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.06

5.2.2 Biomass measurement

The biomass concentration in [g.L⁻¹] was determined through a curve adjustment between values of optical density and dry weight, measured daily for a total period of 10 days. Optical density was measured at wavelength 570 nm (OD_{570nm}) (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014) using a spectrophotometer (UV-1600, Pro-analyze). The dry biomass concentration was measured by weighing samples filtered using 0.7 µm pre-weighed membranes, which were dried in an oven at 100°C for 24 h. The linear adjustment between absorbance values and dry weight is

$$\text{Biomass [g.L}^{-1}\text{]} = 0.4669 \cdot \text{OD}_{570\text{nm}} - 0.0243 \quad (1)$$

this equation must be used to convert absorbance values to biomass.

The initial cell concentration of *Scenedesmus* sp. was 0.1 g.L⁻¹ and the algae growth was monitored by measuring the absorbance every day.

5.2.3 Sample pretreatment for lipid measurement

Samples were conditioned for the lipids extraction of microalgae. First, the samples were obtained by centrifugation (6000 rpm, 30 min, 10°C). Then, drying was carried out in an oven with a tangential airflow at 40°C. To evaluate the adequate drying time, previous tests were performed using different weights of wet biomass. Figure 5.1 shows that the samples dried completely in less than 6 hours.

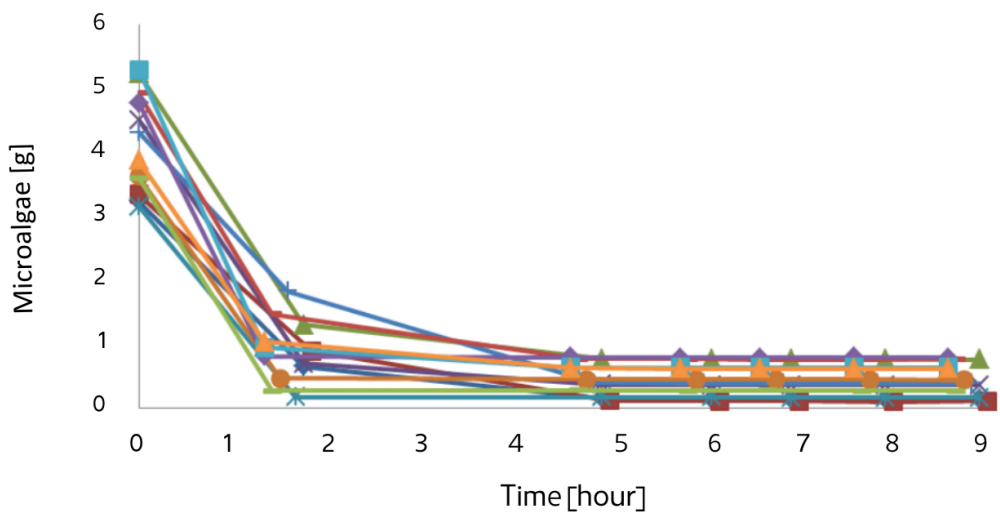


Figure 5.1. Microalgae drying curve in an oven at 40°C for 9h.

5.2.4 Photobioreactors used for lipid determination

Seven air-lift photobioreactors were installed (more information about the structure is provided in the work of Gris et al. (2013)). As Xin (2011) suggested, the photobioreactors should be maintained at 20°C, the ideal temperature to obtain higher lipid content. Secondly, the airflow was injected into each photobioreactor at a flow rate of 0.75 L.min⁻¹ as well as luminous intensity of 10000 lux (~135 µmol.m⁻².s⁻¹) and photoperiod of 12h light and 12h dark.

5.2.5 Lipid quantification

The lipid content of microalgae was quantified in triplicate from day 5 to day 10 using two methods: gravimetric and fluorescence. The volume required to perform the gravimetric method for lipid quantification between days 5 to 10 corresponds to 48% of the total volume of the experiment. The method of fluorescence spectroscopy required less than 1%. The volume required for the biomass quantification for days 0 to 10 corresponds to 26% of the total culture volume. The lipid quantification was not performed from day 0 to 4 because the gravimetric method required larger sample volumes for those days (> 3L per sample) and the remaining culture (25%) did not have enough volume to provide for all samples.

5.2.6 Lipid determination: Gravimetric method

In order to quantify the microalgal lipid content, the gravimetric method was applied. Previous experiments demonstrated that Bligh and Dyer's method provides better recovery of lipids. The method was adapted to be used in microalgae cultivation. For 500 mg of dry biomass, a volume of 30 mL of chloroform was added, followed by 10 mL of methanol. The resulting mixture was transferred to a 50 mL plastic tube and sonicated for 30 minutes (Ultrasonic Bath Unique 1400A MaxiClean 40 kHz, Brazil) at 25°C. After this, 12 mL of a 1% NaCl solution was added and the tube content was transferred to a separatory funnel. After vigorous stirring, the solution separates into two phases. The lipid phase was filtered. Secondly, the lipid content was transferred to a known mass volumetric flask and placed on a rotary evaporator at 30°C until complete removal of the solvent, and then transferred to a desiccator until it reaches room temperature. Following this process, the flask with the resulting sample was weighed and the number of lipids was obtained by mass difference. All samples were measured in triplicate.

5.2.7 Lipids determination: Fluorescence

The content of lipids in microalgae was determined using 2D fluorescence after the Nile Red staining. Before collecting the two-dimensional fluorescence spectrum, approximately 1mL of microalgae culture was mixed and exposed to 40°C for ten minutes, and then Nile Red solution (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ethanol) was added.

Samples were measured in a quartz cuvette with four polished windows and 1 cm of the optical path. The two-dimensional fluorescence spectra were generated at a range of emission wavelengths between 300 nm and 800 nm and excitation wavelengths from 300 nm to 850 nm, with 10 nm increments. The fluorescence spectra were acquired with a spectrofluorometer (FluoroMax-4, Horiba). The fluorescence matrixes were later unfolded as row vectors, where the row represented the sample and each column represented the fluorescence intensity of one Ex/Em pair. All measurements were made in triplicate.

The search for the specific excitation-emission (Ex/Em) pairs that had a greater correlation with the lipid content in the samples was done using the PSCM algorithm (Pure Spectra Chemometric Modelling), developed by Ranzan et al. (2014). The algorithm is based on Ant Colony Optimization, a methodology that tries to mimic the indirect communication between real ants in a colony using chemical tracers, called pheromones. Briefly, the aim of the method is to use pheromones to optimize the variable selection of spectral features that will be used to fit a linear model capable to predict an output of interest, similarly as ants use pheromone trails to converge to the

shortest route between a food source and the nest. Figure 5.2 presents a schematic representation of the ACO implementation used in this study.

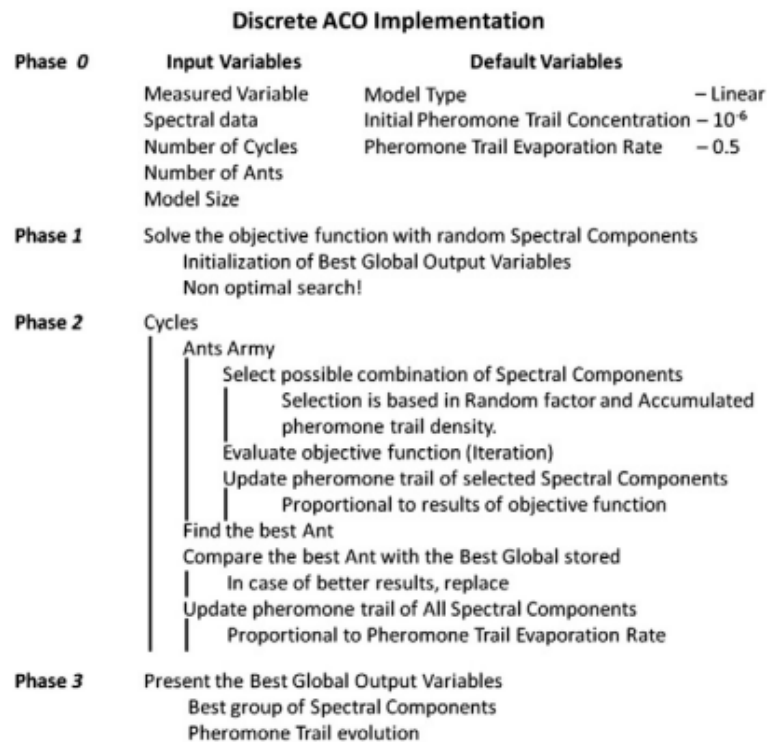


Figure 5.2. Schematic ACO algorithm. Extracted from Ranzan et al. (2015).

As can be seen in Figure 5.2, the algorithm is divided into 4 phases. Phase 0 supplies the input data and defines the optimization parameters: in this study, the spectral data is the matrix of unfolded two-dimensional fluorescence spectra, the measured variable is the corresponded percentage of the lipid content of each sample (analytical result obtained by the traditional Bligh and Dyer method), the number of cycles was defined as 300 and the number of ants as 400. As for model size (number of Ex/Em pairs each ant will select as input for the linear models), the algorithm was run multiple times, keeping the same parameters, but varying the model size between 1 and 4, to evaluate the predictive performance of models with different complexities. By default, in the initial pheromone trail, every Ex/Em pair has the same pheromone concentration. All fitted models will be linear regressions, and the pheromone evaporation rate (amount of pheromone evaporated at the end of each cycle) is 50%.

In phase 1, totally random Ex/Em pairs are selected, and a linear model is fit to predict the output variable. The selected inputs and the model's predictive metrics are stored to initialize the global solution.

Phase 2 is the core of the optimization: each ant will, in parallel, select n (model size) Ex/Em pairs, based on a random trigger and in the accumulated pheromone trail - although every variable has a chance to be selected, the more pheromone a variable has, the greater its chance to be selected. Then, each ant will use its selected pairs to fit a linear model to predict the output of interest. The residual error between the measured output and the predicted output is calculated (in this case, the root mean square error - RMSE), and the ant will deposit an increment of pheromone in the selected pairs that are inverse to the residual error: the greater the error, the smaller the pheromone increment. After every ant has fitted its models and deposited its pheromones, the ant whose model has the smallest residual error is found and compared to the global solution: if it is better, this ant's model becomes the new global solution. The pheromone trail is then multiplied by the pheromone trail evaporation

rate, to penalize variables that were not selected or that participated in models with high errors. This routine is repeated i (number of cycles) times. As the cycle passes, variables that have a greater correlation with the desired output receive more pheromones and are selected more times.

In phase 3 the global solution is presented, with its selected inputs and metrics, and the final pheromone trail.

To truly evaluate the predictive power of the methodology, the complete sample dataset was split into training and test subsets. The training subset is the only one supplied to the ACO algorithm. Once the global solution is obtained, the model is used to predict the percentage of lipid content in samples never seen before by the model - the test subset. If the test metrics are consistent with the training metrics, the ability of the model to deal with new data is confirmed, and the models can be considered more robust and reliable. The train/test split was based on the γ -rank methodology: the samples were sorted in ascending order of the output of interest (in this case, the percentage of lipid content), and then the samples were allocated to the train and test subsets following the pattern 2 (train) to 1 (test) (RANZAN et al., 2015; SANTOS et al., 2019b). The split resulted in a training subset with 66% of the total samples (8 samples) and a test subset with 34% (4 samples).

To compare and evaluate models, three metrics are used throughout this work: (i) mean absolute percentage error (MAPE) defined as

$$MAPE = \frac{100\%}{n} \sum_i^n \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right| \quad (2)$$

where n is the number of samples, y_i the real value of the output and \hat{y}_i the predicted value of the output; (ii) root mean square error (RMSE) defined as

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3)$$

and (iii) the coefficient of determination (R^2) defined in Equation (4),

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (4)$$

where \bar{y} is the mean value of y_i .

In addition, it was evaluated two different approaches for the selection of pairs: (i) The use of the whole spectra (WS) and (ii) the use of only the spectra's area of greater fluorescence (AGF) - Emission between 550 nm and 750 nm - as can be seen in Figure 5.3.

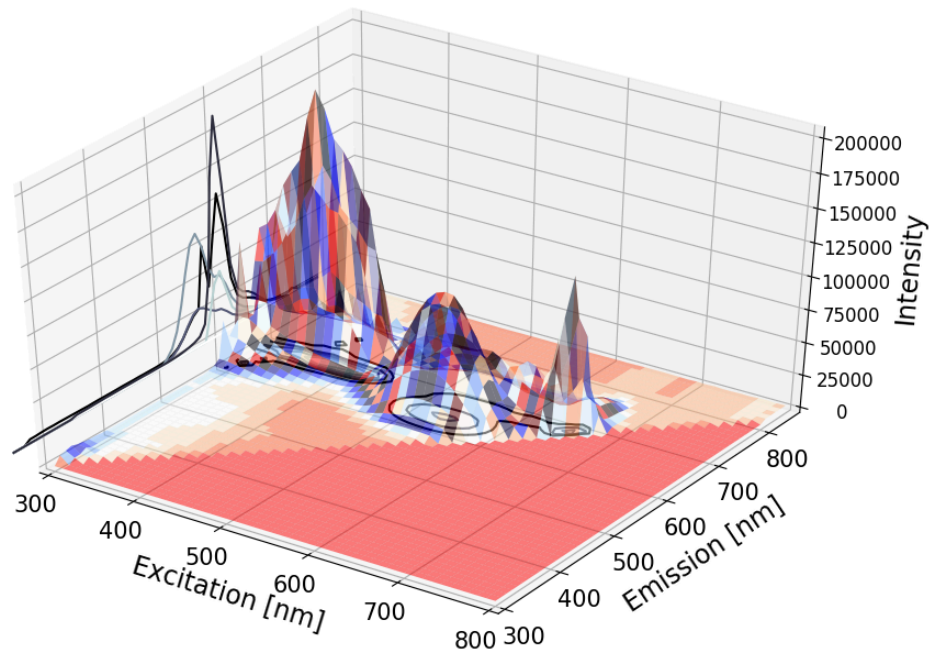


Figure 5.3. Mean fluorescence spectra of all microalgae samples.

5.3 Results

5.3.1 Microalgae growth curve

Measurement of the biomass concentration in the exponential growth phase was performed, as shown in Figure 5.4.

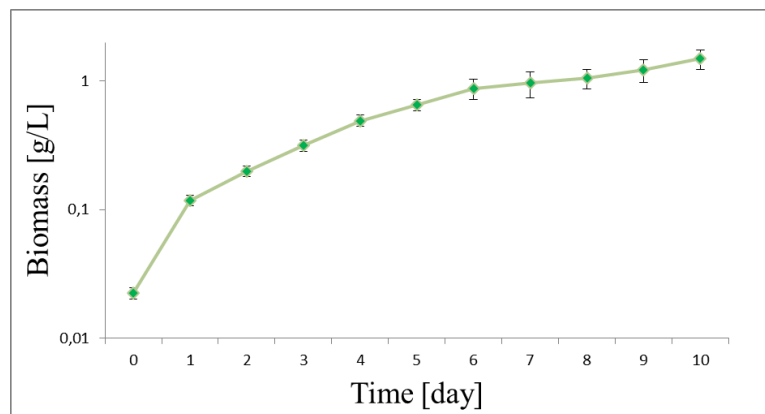


Figure 5.4. Growth logarithmic curve microalgae *Scenedesmus* sp. in air-lift photobioreactors under conditions of 20°C and 10,000 lux.

5.3.2 Lipid Content: Gravimetric Method

Figure 5.5 presents the lipid extraction results obtained by the traditional method Bligh and Dyer. It is observed that the contents reached maximum concentration on day 7, and the percentage was similar during the followed days.

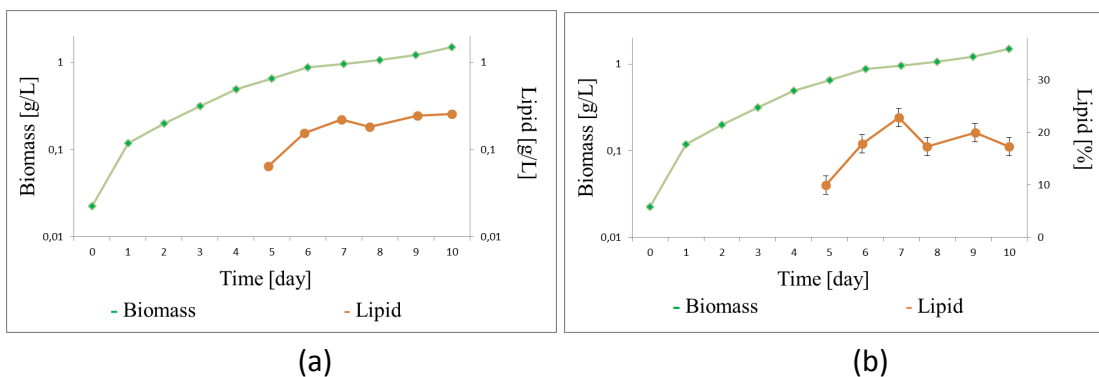


Figure 5.5. Biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus* sp. (a) comparison between biomass concentration and lipid concentration, (b) comparison between biomass concentration and lipid content.

Figure 5.5a shows the biomass concentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$] and the behavior of the concentration of the lipids throughout the cultivation. It was observed that the lipid content increased with the biomass concentration.

Between days 5 to 7, the concentration of the lipids doubled per day (i.e., 100%) but between days 7 to 10 only increased by 1.3 times. Similarly, Figure 5.5b shows the behavior of the lipids percentage [%] for a sample of 500 mg per day. This allowed us to see that the percentage reached a maximum on day 7, and, in the following days, it was reduced by 5%. Therefore, it may be useful to extract the lipids on day 7 (or add more culture medium in a new photobioreactor for a faster increase in lipids) or continue the culture to obtain larger amounts of biomass.

The results of the analytical method of Bligh and Dyer (seen in Figures 5.5a and 5.5b) were used as measured variables for the characterization of lipid concentration using two-dimensional fluorescence spectra and PSCM. Models were trained with 1 to 4 excitation/emission pairs of fluorescence, using the 8 samples selected for the training subset and then tested with the 4 samples of the test subset.

Table 5.3. Metrics for the best predictive model of each size and the selected Ex/Em pairs

Whole Spectra							Area of Greater Fluorescence						
Train			Test				Train			Test			
MS	R^2	MAPE	RMSE	R^2	MAPE	RMSE	MS	R^2	MAPE	RMSE	R^2	MAPE	RMSE
1	0.399	27.54	4.51	0.933	15.15	2.78	1	0.336	29.48	4.74	0.767	21.40	3.47
2	0.940	4.94	1.42	0.448	14.25	2.80	2	0.775	15.04	2.76	0.953	7.42	1.07
3	0.990	2.24	0.59	0.963	5.97	0.85	3	0.995	1.60	0.42	0.762	10.68	1.91
4	0.997	1.32	0.34	0.999	0.59	0.11	4	0.998	1.37	0.25	0.987	4.43	0.78
MS	Selected Excitation/Emission Pairs						MS	Selected Excitation/Emission Pairs					
1	460/740						1	540/700					
2	310/330 370/480						2	550/620 540/630					
3	370/480 580/750 760/770						3	340/650 550/700 430/710					
4	370/480 610/700 580/750 760/770						4	460/650 310/660 470/660 530/700					

Table 5.3 shows the metrics for the global solution models of each size, and the Ex/Em pairs relative to those models. The results are divided by the search throughout the whole spectra and the search focused on the area of greater fluorescence.

Figure 5.6a and Figure 5.6b illustrate the location of the selected pairs, plotted upon a contour map of the mean fluorescence spectra of all microalgae samples. Figure 5.6a shows all the selected pairs for the whole spectra models and Figure 5.6b the selection for the AGF.

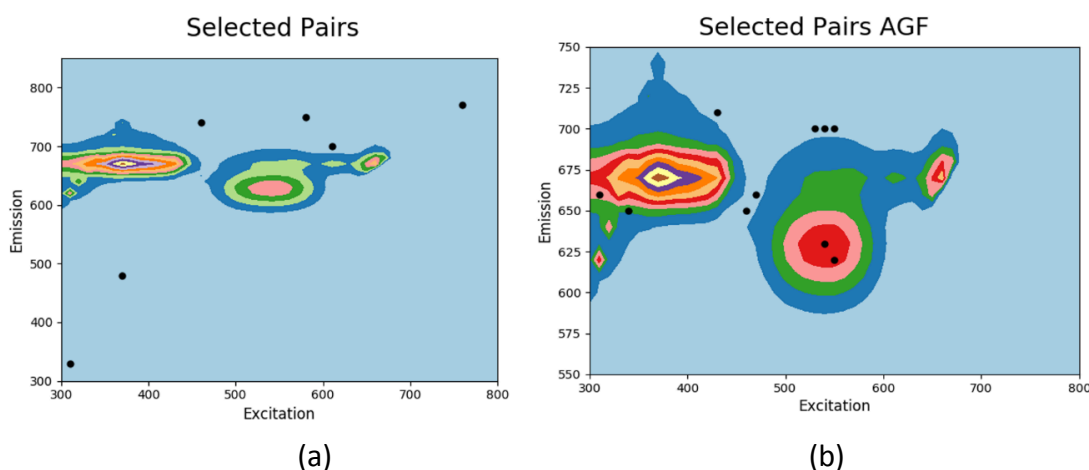


Figure 5.6. All the selected pairs for (a) the whole spectra models and (b) the AGF models

5.4 Discussion

The percentage of lipids present in the samples of this work matches the lipid content of *Scenedesmus* sp. presented in the bibliography, with values between 8% and 30%, which depend on the cultivation conditions (CASTRILLO et al., 2013; CHU et al., 2020; ROCHA et al., 2019). With the use of Nile Red, we achieved results similar to those obtained by Balduyck et al. (2015) who used Nile Red to determine lipids in *Nannochloropsis oculata* and *T-Isochrysis lutea*, comparing results of lipid content using Nile Red for fluorescence measures and gravimetric method. Balduyck et al. fitted models using only one Ex/Em pair with R^2 of 0.91, while in our study, the implemented models were able to achieve better model results, i.e. R^2 of 0.99 using four Ex/Em pairs.

Ren et al. (2015) have noted the importance of breaking the cell membrane of *Scenedesmus* sp. and proposed using ultrasound as a pre-treatment of samples before being analyzed in the spectrofluorometer. They obtained satisfactory results in the excitation range from 500 to 600 nm and emission from 550 to 620 nm. These results are within the range of analysis proposed in this work, demonstrating that it is possible to obtain equivalent results using our procedure without the need to break the cell wall as their proposal.

Sá et al. (2020) evaluated the effectiveness of data processing and the application of PCA (principle component analysis) and PLS (partial least squares) methods, achieving predictive results with R^2 superior to 0.81, proving that chemometric methods can be useful to quantify lipids. In our study, the application of the PSCM method, associating chemometric models, and the use of the ACO algorithm to optimize the selection of Ex/Em pairs, we were able to predict lipid concentration with R^2 above 0.99, using only 4 Ex/Em pairs. Our results indicate that using the PSCM methodology, it is possible to predict the concentration of the lipids satisfactorily, with

mean absolute errors smaller than 5%. The use of the whole spectra yielded the best overall models, selecting Ex/Em pairs that have relatively small fluorescence intensity. The AGF models also satisfactorily predicted the percentage of lipid concentration in the samples.

Under the same culture conditions, it is possible to determine the lipid concentration of each sample using the chemometric models generated in this work, being necessary only 15 to 30 min for the preparation and quantification of each sample. This time is significantly smaller than the time required for the extraction by the Bligh and Dyer method, which takes on average 3 hours. The results obtained in this work present better results with an average R^2 of 0.998 using our methodology for the selection of fluorescence excitation/emission wavelength pairs.

5.5 Conclusion

This study demonstrates that the combination of fluorescence spectroscopy and chemometric modeling is capable of quantifying lipids in microalgae *Scenedesmus* sp. Therefore, fluorescence has the potential to provide a fast characterization technique, which may enable lipid content monitoring. In the tests performed, it was possible to satisfactorily predict the concentration of lipids in microalgae samples using a combination of Nile Red, fluorescence measurements, and the PSCM methodology.

The best models trained with our methodology using four Ex/Em pairs presented a mean absolute error smaller than 5% and R^2 of almost 0.99 for the training and test subsets, both for the search of pairs in the whole spectra and the focused search in the area of greater fluorescence. Once the test metrics were comparable and consistent with the training metrics, the models can be considered robust and able to correctly deal with new information.

Characterizing the concentration of lipids in microalgae samples using Nile Red and fluorescence spectroscopy measurements showed promising results. The proposed methodology is much more time-efficient than the traditional gravimetric method, requiring less than 30 minutes when the traditional methods can take up to 5 hours.

Capítulo 6 - Characterization of bio-oil obtained from fast pyrolysis of *Scenedesmus* sp.

Abstract: The fast pyrolysis process is a form of rapid thermal decomposition of organic material in the absence of oxygen. The efficacy of this technique in converting various forms of biomass, such as microalgae, into bio-oil—a useful fuel or raw material for chemical compounds—has been investigated. In the current study, microalgae *Scenedesmus* sp were pyrolyzed at 600°C. The composition of the bio-oil produced from fast pyrolysis is similar but not equal to other authors. The bio-oil yield is around 20%. According to the findings, there are nitrogenous (17.59%), oxygenated (19.76%), and hydrocarbon (14.13%) compounds available that can be separated for industrial application.

Keywords: microalgae; *Scenedesmus* sp.; fast pyrolysis; bio-oil; fluidized-bed reactor

6.1 Introduction

Pyrolysis is the decomposition of biomass in the absence of oxygen. Fast pyrolysis, which works at high temperatures without oxygen and has a brief residence period, is one kind of pyrolysis utilized to process numerous biomass resources, such as wood, agricultural waste, energy crops, microalgae, and municipal solid waste fraction (CAI; LIU, 2016; FONSECA et al., 2021; RAYMUNDO et al., 2022). Fast pyrolysis produces solid (bio-char), liquid (bio-oil), and gas products., offering a versatile and eco-friendly way to produce chemicals and biofuels. Bio-oil generated can be used as fuel or as a raw material for chemical products (BRIDGEWATER, 2004; BRIDGWATER, 2012; RAYMUNDO et al., 2022; SHEN; WU, 2023). The best operating conditions for obtaining bio-oil through fast pyrolysis of rice husk, according to Cai and Liu (2016), include controlled reaction temperature around 550°C to maximize liquid yield, short residence times of hot vapors, generally less than 2 seconds, to minimize secondary reactions, rapid removal of produced char to minimize vapor breakdown, and rapid cooling of pyrolysis vapors to obtain bio-oil product. These conditions ensure a high yield of quality bio-oil, and byproducts such as biochar and gas, which might be used as energy sources.

Microalgae can be a rich source of carbon compounds, which can be used to make biofuels, health supplements, medicines, and cosmetics (KHAN; SHIN; KIM, 2018). Interest in microalgae as a renewable and sustainable feedstock for biofuels production and other value-added products has inspired a new approach to biorefinery. Despite the potential of microalgae, developing an efficient procedure for producing biofuels and extracting bioproducts remains a significant technological and economic challenge for commercial implementation. In this sense, fast pyrolysis is an effective method for obtaining by-products such as bio-oil from microalgae biomass (CHEN et al., 2015; GAUTAM; VARMA; VINU, 2017). The pyrolysis properties and product yield of various microalgae species were investigated. *Chlorella* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Nannochloropsis* sp., *Scenedesmus* sp., and others have been pyrolyzed at temperatures that range from 400 to 600°C, yielding bio-oil concentrations of up to 57% (DE MORAIS et al., 2023). According to Jayaraman et al. (2016), microalgae oil may be suitable for application as a diesel engine fuel. Pyrolysis involves the breakdown of microalgae components such as proteins, lipids, and carbohydrates at high temperatures. Reaction pathways and the formation of different compounds during pyrolysis are investigated using techniques such as thermogravimetric differential thermal analysis (TG-DTA), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (GAUTAM; VINU, 2019; NIU; PRINS; RONSSE, 2023).

Francavilla (2015) analyzed the chemical composition of *Dunaliella tertiolecta* bio-oil and studied the kinetics of fast pyrolysis to understand the reaction mechanisms and optimize process conditions. Fast pyrolysis of microalgae offers a promising approach for valorizing microalgal biomass and obtaining valuable products. The main pyrolysis reactions involve dehydration, decarbonylation, decarboxylation, and deamination reactions (MUSTAPHA et al., 2023). This work will present the products obtained from the fast pyrolysis of the microalgae *Scenedesmus* sp. at 600°C. The description will be detailed from cultivation, extraction, and conversion to the characterization of the final product. Analysis of by-products by gas chromatography will provide information on the chemical composition of the bio-oil obtained.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Microalgae cultivation conditions

The microalgae *Scenedesmus* sp. was cultivated at GIMSCOP (Group of Intensification, Modeling, Simulation, Control and Optimization of Processes). The culture medium used was the modified Guillard medium described by Ramirez et al. (2014). The microalgae were cultivated in reactors of 5L (Figure 6.1) at a temperature of 25°C, light intensity of 13000 lux ($176 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), photoperiod of 12h/12h (light/dark), agitation by aeration with two porous stones in each reactor with a filtered air supply at a flow rate of 0.5 v.v.m. (volume of air per volume of liquid per minute).

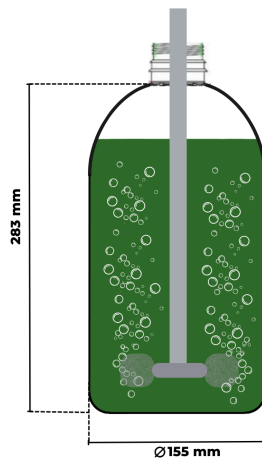


Figure 6.1. Photobioreactor dimensions and aeration system layout for biomass cultivation.

6.2.2 Biomass measurement

The microalgae growth was measured based on the optical density at 570 nm (Pró-Análise UV-1600 spectrophotometer, Brazil). Dry weight was measured by filtering culture samples through 0.7 μm porosity filters and dried in an oven at 100°C for 24 hours. The relationship between dry weight and absorbance to determine the growth curve is defined by

$$C_{\text{biomass}} [\text{g}\cdot\text{L}^{-1}] = \text{OD}_{570} \times 0.364 + 0.0187 \quad (1)$$

where C_{biomass} is the biomass concentration in the culture medium and OD_{570} is the optical density at 570nm. The correlation coefficient (R^2) is 96.1%.

6.2.3 Biomass preparation for fast pyrolysis

Biomass drying was carried out in an oven with a tangential airflow at 40°C for 10 hours (until the sample weight stabilized).

Before pyrolysis, biomass was ground to reduce particle size using a Wiley Mill, followed by particle size determination using an electromagnetic sieve shaker. The ground samples were stored in a desiccator to prevent the prepared sample from becoming humidified.

6.2.4 Fast pyrolysis conversion

The pyrolysis plant used in the experiment consists of a fluidized-bed reactor, an exhaust chamber, a biomass feeding system, a biochar separation through a cyclone, a bio-oil condensation system through a condenser and electrostatic precipitator (see Figure 6.2). More information about the structure is provided in the work of Raymundo et al. (2022).

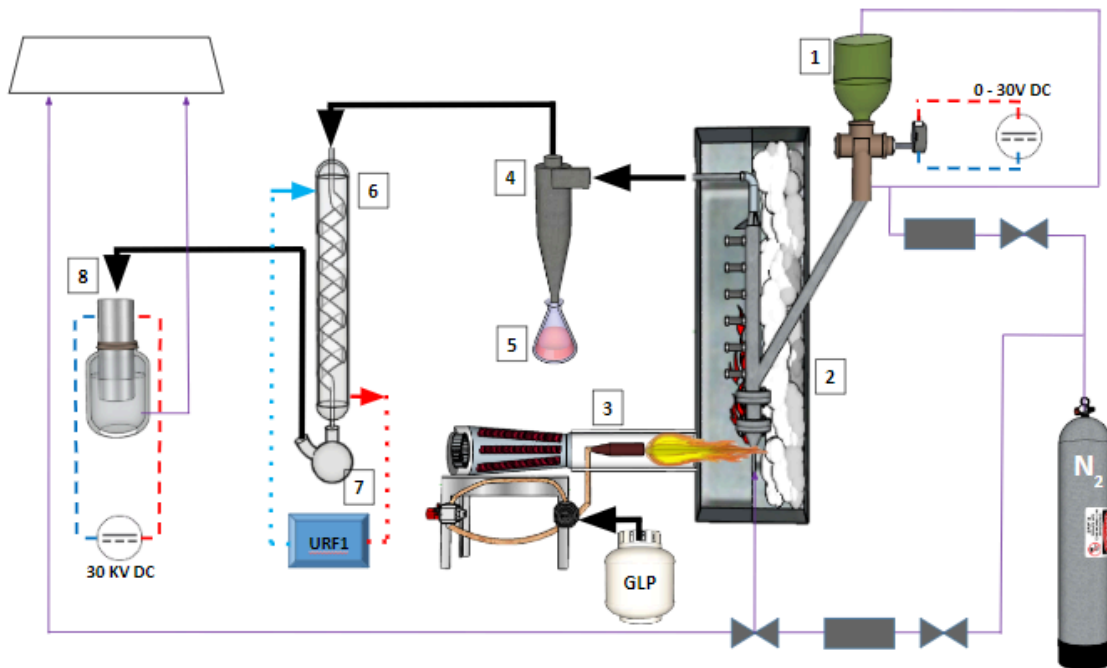


Figure 6.2. Process diagram of laboratory-scale pyrolysis system: 1. Feeder, 2. fluidized-bed reactor, 3. Heat gun, 4. Cyclone, 5. Biochar collector, 6. Condenser with online separation column, 7. Bio-oil collector, 8. Electrostatic precipitator.

The fast pyrolysis plant was operated under the following conditions for this experiment: 20 g samples (28-35 mesh Tyler), controlled gas flow of $8.4 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1}$, fluidized-bed reactor operating at 600°C , feed rate of $0.8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$, and an estimated 0.35 s volatile residence period based on plug flow. The microalgae biomass is introduced through a feeder that comes into contact with the heated medium that has been fluidized using nitrogen as a carrier gas. The biochar was collected at the bottom of the cyclone. The bio-oil was recovered from different separation stages (the condenser and the precipitator).

The following equations were used to calculate the product yields of fast pyrolysis experiments:

$$\text{Bio-oil yield (\%)} = w_{\text{bio-oil}} / w_{\text{biomass}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Biochar yield (\%)} = w_{\text{biochar}} / w_{\text{biomass}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Gas yield (\%)} = 100\% - \text{Bio-oil yield (\%)} - \text{Bio-oil yield (\%)} \quad (4)$$

where $w_{\text{bio-oil}}$, w_{biochar} and w_{biomass} are the weights of bio-oil, biochar and initial microalgal biomass respectively on dry basis.

6.2.5 Bio-oil characterization: Chromatographic analysis

The bio-oil samples were rinsed with hexane to remove them from the collector and prepared to be sent to the laboratory of the Institute of Analytical Chemistry at the Federal University of Rio Grande do Sul, for analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Analyzes were performed to determine the composition of the liquid products. The procedure is detailed in the work of Lazzari et al. (LAZZARI et al., 2018). Lazzari et al. explain that the samples were injected into the GC/qMS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an AOC20 autoinjector (split/splitless). Chromatographic separation was performed on the DB-5 non-polar analytical column (60 m length, $250 \mu\text{m}$ inner diameter, and $0.25 \mu\text{m}$ stationary phase

thickness) purchased from Agilent Technologies – J&W Scientific (Palo Alto, CA, USA). The GCMS-solution software 2.6.1 (Shimadzu, Japan) processed all data.

By comparing the spectra of the bio-oil molecules with those in the NIST database, the compounds were identified (only peaks with mass spectra similarity from at least 70% were evaluated).

6.3 Results and discussion

6.3.1 *Scenedesmus* sp. growth curve

The microalgae *Scenedesmus* sp growth curve is depicted in Figure 6.3. It has been noted that harvesting biomass with an approximate concentration of 1 g.L^{-1} can be done on the tenth day (insignificant standard deviation is not discernible in the Figure 6.3).

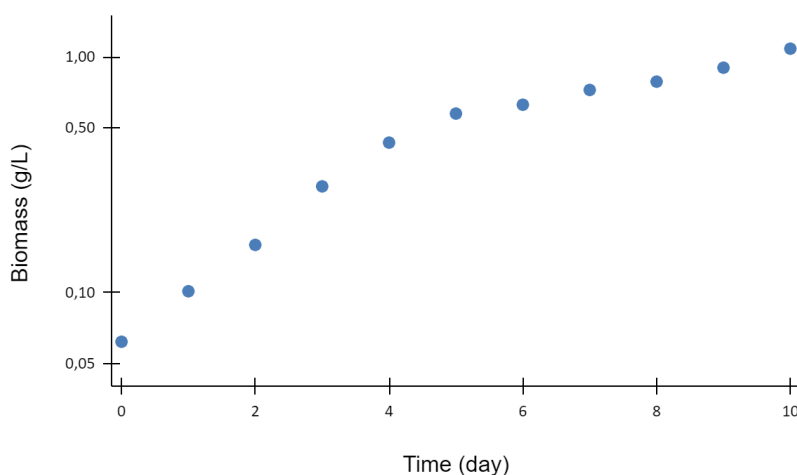


Figure 6.3. Biomass logarithmic growth curve of *Scenedesmus* sp.

6.3.2 Products obtained from microalgae pyrolysis

Fast pyrolysis has generated liquid (bio-oil), solid (biochar) and gaseous products from the biomass of the microalgae *Scenedesmus* sp. The resulting biochar is characterized by being a black substance. The generated bio-oil presented a dark brown color. The gases could not be collected in the pyrolysis plant. Fast pyrolysis of the microalgae *Scenedesmus* sp. resulted in the following distribution: $15.9 \pm 1.6\%$ bio-oil, $35.1 \pm 2.2\%$ biochar, and $49.0 \pm 3.5\%$ gas.

When compared to Mustapha et al. (2023), who reported a bio-oil yield of 43% in the pyrolysis of *Scenedesmus* sp. at the same temperature, the bio-oil yield in this study is closer to 20%. This disparity is likely due to the specific operating conditions of the pyrolysis plant, such as the type or shape of the reactor, fluidization conditions, and characteristics of the condensation system.

The percentage of biochar varied between 32 and 37%, which is close to the research results of Mustapha et al. (2023) (31%) and Kim et al. (2014) (26.4%). It might support the theory that operational variables, such as condensation conditions and losses during the bio-oil collecting process, could account for the observed high quantity of gas resulting from the weight differential and explain why the results of the amount of bio-oil differ from those reported in the literature.

6.3.3 Compounds identified in bio-oil

Gas chromatography (GC–MS) was utilized to examine the chemical composition of the bio-oil obtained from the pyrolysis of *Scenedesmus* sp. microalgae. Based on the collected data, hundreds of chemical compounds were found, but only those with a mass spectra similarity higher than 71% were recognized.

The compounds identified in the bio-oil from the pyrolysis of the *Scenedesmus* sp. microalgae were divided into six main groups: 1) phenols, 2) alcohols, 3) carboxylic acids and esters, 4) other oxygenated compounds (ketones, aldehydes), 5) nitrogenous compounds (amides, nitriles, indoles), 6) hydrocarbons (aromatic, cyclic, aliphatic). Table 1 compares these groups identified by GC–MS.

Table 6.1. Comparison of major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from fast pyrolysis of *Scenedesmus* sp.

Distribution of product types	Area [%]
Phenols	7.99
Alcohols	2.59
Carboxylic acids and esters	2.98
Other oxygenated compounds	6.2
Hydrocarbons	14.13
N-containing compounds	17.59
Unidentified/ Others	48.52

According to Table 6.1, the bio-oil from pyrolysis of *Scenedesmus* sp. is a complex mixture of organic compounds with different structures. Table 6.2 provides a list of the principal chemicals identified by comparison with the NIST database. The references cited in Table 6.2 corroborate that other authors have also found these compounds in the bio-oil of the microalgae *Scenedesmus* obtained from their experiments.

Table 6.2. Major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from pyrolysis of *Scenedesmus* sp.

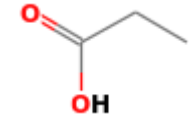

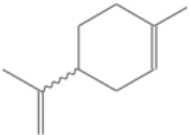
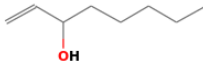
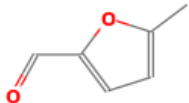
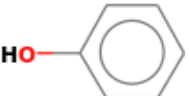
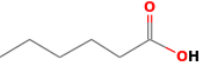
Peak	Mass spectra similarity [%]	Compound	CAS	Formula	Chemical structure	Classification	Other findings
1	81	Propanoic acid	79-09-4	C ₃ H ₆ O ₂		Oxygenated /carboxylic acid	(MUSTAPHA et al., 2023)
2	77	Pentanal	110-62-3	C ₅ H ₁₀ O		Oxygenated/Others (ketones, aldehyde)	(OLIVEIRA et al., 2021)
8	95	Limonene	138-86-3	C ₁₀ H ₁₆		Aliphatic hydrocarbon / Cyclic monoterpene	(ANDRADE et al., 2018b; OLIVEIRA et al., 2021)
25	82	1-Octen-3-ol	3391-86-4	C ₈ H ₁₆ O		Oxygenated /Alcohols	(OLIVEIRA et al., 2021)
26	77	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	620-02-0	C ₆ H ₆ O ₂		Oxygenated/Others (ketones, aldehyde)	(SUBAGYONO et al., 2023)
29	93	Phenol	108-95-2	C ₆ H ₆ O		Oxygenated/phenols	(FRANCAVILLA et al., 2015; KIM; KOO; LEE, 2014; MUSTAPHA et al., 2023)
30	72	Hexanoic acid	142-62-1	C ₆ H ₁₂ O ₂		Oxygenated /carboxylic acid	(KIM; KOO; LEE, 2014; MUSTAPHA et al., 2023)

Table 6.2. Major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from pyrolysis of *Scenedesmus* sp. (Cont.)

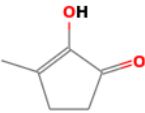
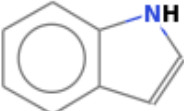
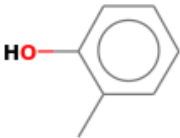
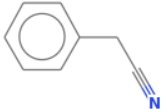
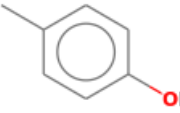
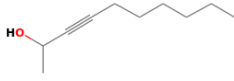

Peak	Mass spectra similarity [%]	Compound	CAS	Formula	Chemical structure	Classification	Other findings
36	92	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-	80-71-7	C ₆ H ₈ O ₂		Oxygenated /Others (ketones, aldehyde)	(FRANCAVILLA et al., 2015)
40	95	Indole	120-72-9	C ₈ H ₇ N		N-containing compounds	(FRANCAVILLA et al., 2015; HU et al., 2013; KIM; KOO; LEE, 2014; MUSTAPHA et al., 2023)
44	82	o-Cresol	95-48-7	C ₇ H ₈ O		Oxygenated /phenols	(FRANCAVILLA et al., 2015)
45	87	Benzyl nitrile	140-29-4	C ₈ H ₇ N		N-containing compounds	(FRANCAVILLA et al., 2015)
49	87	p-Cresol	106-44-5	C ₇ H ₈ O		Oxygenated /phenols	(FRANCAVILLA et al., 2015; KIM; KOO; LEE, 2014; NYONI; HLANGOTHI, 2022)
50	73	3-Decyn-2-ol	69668-93-5	C ₁₀ H ₁₈ O		Aliphatic hydrocarbon/ inol	(PERVEEN et al., 2022)
60	90	4-Ethylphenol	123-07-9	C ₈ H ₁₀ O		Oxygenated /phenols	(FRANCAVILLA et al., 2015)

Table 6.2. Major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from pyrolysis of *Scenedesmus* sp. (Cont.)

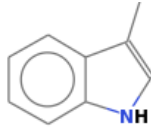
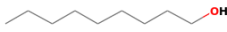
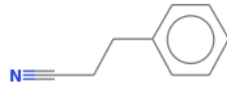

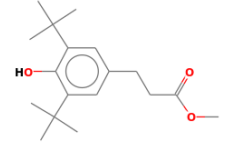

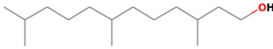
Peak	Mass spectra similarity [%]	Compound	CAS	Formula	Chemical structure	Classification	Other findings
61	95	3-Methyindole	83-34-1	C ₉ H ₉ N		N-containing compounds	(FRANCAVILLA et al., 2015; KIM; KOO; LEE, 2014)
68	76	1-Nonanol	143-08-8	C ₉ H ₂₀ O		Oxygenated /Alcohols	(OLIVEIRA et al., 2021)
69	93	Benzenepropanenitrile	645-59-0	C ₉ H ₉ N		N-containing compounds	(ANDRADE et al., 2018b; FRANCAVILLA et al., 2015; TORAMAN et al., 2016)
102	95	1-Tetradecene	1120-36-1	C ₁₄ H ₂₈		Aliphatic Hydrocarbon /Olefin	(ANDRADE et al., 2018b; FRANCAVILLA et al., 2015; HU et al., 2013; NYONI; HLANGOTHI, 2022)
130	75	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester	6386-38-5	C ₁₈ H ₂₈ O ₃		Oxygenated/ Ester	(FRANCAVILLA et al., 2015)
138	94	Heptadecane	629-78-7	C ₁₇ H ₃₆		Aliphatic hydrocarbon /Paraffin	(GHEDA; ISMAIL, 2020; MUSTAPHA et al., 2023; NYONI; HLANGOTHI, 2022)
143	91	3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol	6750-34-1	C ₁₅ H ₃₂ O		Oxygenated /Alcohols	(FRANCAVILLA et al., 2015)

Table 6.2. Major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from pyrolysis of *Scenedesmus* sp. (Cont.)

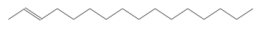

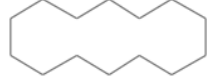


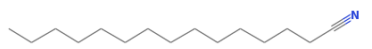
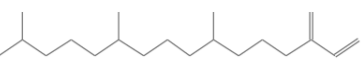
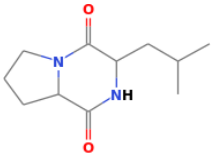
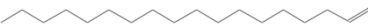
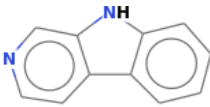
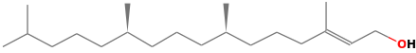
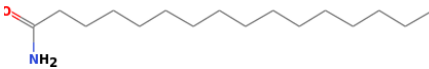
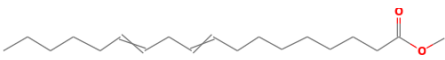
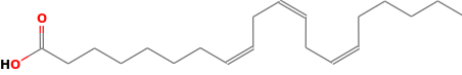
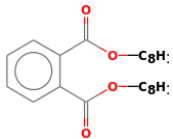
Peak	Mass spectra similarity [%]	Compound	CAS	Formula	Chemical structure	Classification	Other findings
148	90	2-Hexadecene	26741-29-7	C ₁₆ H ₃₂		Aliphatic hydrocarbon / Olefin	(MUSTAPHA et al., 2023)
166	89	8-Heptadecene	54290-12-9	C ₁₇ H ₃₄		Aliphatic hydrocarbon / Olefin	(MUSTAPHA et al., 2023)
169	84	Cyclotetradecane	295-17-0	C ₁₄ H ₂₈		Aliphatic hydrocarbon /Paraffin	(AYSU; SANNA, 2015)
176	86	Tetradecanonitrile	629-63-0	C ₁₄ H ₂₇ N		N-containing compounds	(ANDRADE et al., 2018b)
184	95	1-Nonadecene	18435-45-5	C ₁₉ H ₃₈		Aliphatic hydrocarbon /Olefin	(ISMAIL; ELKOMY, 2022; KIM; KOO; LEE, 2014; NYONI; HLANGOTHI, 2022)
186	71	Pentadecanonitrile	18300-91-9	C ₁₅ H ₂₉ N		N-containing compounds	(HU et al., 2013; TORAMAN et al., 2016)
195	95	Neophytadiene	504-96-1	C ₂₀ H ₃₈		Aliphatic hydrocarbon /branched	(KIM; KOO; LEE, 2014; MUSTAPHA et al., 2023)
196	80	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	5654-86-4	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂		N-containing compounds	(TORAMAN et al., 2016)

Table 6.2. Major chemical compounds identified by GC–MS analysis in bio-oil from pyrolysis of *Scenedesmus* sp. (Cont.)

Peak	Mass spectra similarity [%]	Compound	CAS	Formula	Chemical structure	Classification	Other findings
203	87	1-Octadecene	112-88-9	C ₁₈ H ₃₆		Aliphatic hydrocarbon /Olefin	(NYONI; HLANGOTHI, 2022)
227	77	9H-pyrido[3,4-b]indole	244-63-3	C ₁₁ H ₈ N ₂		N-containing compounds	(TORAMAN et al., 2016)
229	90	Phytol	150-86-7	C ₂₀ H ₄₀ O		Oxygenated /Alcohols	(AYSU; SANNA, 2015; FRANCAVILLA et al., 2015; HU et al., 2013; NYONI; HLANGOTHI, 2022)
232	91	Hexadecanamide	629-54-9	C ₁₆ H ₃₃ NO		N-containing compounds	(HU et al., 2013; NYONI; HLANGOTHI, 2022; TORAMAN et al., 2016, 2016)
238	77	9,12-octadecadienoic acid, methyl ester	2462-85-3	C ₁₉ H ₃₄ O ₂		Oxygenated /Ester	(GHEDA; ISMAIL, 2020; ISMAIL; ELKOMY, 2022)
282	71	8,11,14-eicosatrienoic acid	7324-41-6	C ₂₀ H ₃₄ O ₂		Oxygenated /carboxylic acids	(ARUTSELVAN et al., 2021)
295	95	2-ethylhexyl phthalate	27554-26-3	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		Oxygenated /Others (ketones, aldehyde)	(GHEDA; ISMAIL, 2020)

As previously indicated, GC-MS was used to examine the chemical composition of the bio-oil produced by pyrolysis of *Scenedesmus* sp. biomass. It is evident from the quantity of peaks that emerges that bio-oil is a complex liquid with a wide range of compounds. Similar to Mustapha et al. (2023) results, which characterized the bio-oil of *Scenedesmus obliquus*, the main compounds present in the bio-oil produced were aromatic, aliphatic, nitrogen-containing, and others (which include alcohols, aldehydes, ketones, and esters). According to Mustapha et al. (2023) the higher lipid content in the microalgae biomass converted during pyrolysis into acids and hydrocarbons may cause the higher amounts of aliphatic hydrocarbons and acids in bio-oil. The decomposition of carbohydrates through pyrolysis produced phenol and its compounds. Phenol has a significant commercial value. Additionally, the decomposition of protein and carbohydrates was the primary cause of the formation of oxygen-containing molecules, including alcohols, aldehydes, and ketones. Also, Shirazi et al. (2020) observe that the decomposition of carbohydrate constituents produces oxygenated compounds such as ketones and aldehydes; the protein decomposition produces nitrogenous compounds such as pyrroles, indole, and pyrazoles; and the decomposition as well as volatilization of lipid constituents in microalgae produces fatty acids, aliphatic compounds, and fatty ester. Phenols are found in bio-oils independently of the raw material's composition, as noted by Lazzari et al. (2018).

Nyoni et al. (2022) analyzed bio-oil produced from *Scenedesmus* pyrolysis at 400°C using a rotary kiln pyrolyzer running at intermediate pyrolysis regimes. It was found that the main compounds of *Scenedesmus* bio-oil were alcohols, fatty acids, and fatty acid esters (See Table 3). Esterification reactions between alcohols and fatty acids in the pyrolysis produced fatty acid esters. The presence of unsaturated aliphatics, cyclic ketones, and paraffins in the bio-oil can improve the fuel properties. Additionally, Nyoni et al. (2022) mentioned that unsaturated fatty acids in lipids decompose to generate unsaturated aliphatics, and cellulose and polysaccharides undergo hydrolysis and dehydration to produce ketones. Compound groups containing nitrogen are harmful because they increase the emissions of NO_x.

Other experiments with microalgae show bio-oil with the presence of compounds from the saturated and unsaturated aliphatic groups, aromatics, and nitrogenous and oxygenated compounds that are different and present in different quantities. Fonseca et al. (2021) studied the oil from fast pyrolysis at 600°C of the microalgae *Desmodesmus* sp., *Nannochloropsis oculata*, and *Halamphora coffeaeformis*. The number and content of products varied greatly depending on the microalgae species. The author identified the presence of organic groups, but the specific compounds are not mentioned. *Desmodesmus* exhibits aliphatic compounds and esters. *Nannochloropsis oculata* contains a sufficient amount of phenols and nitrogenous chemicals, making it unsuitable for the manufacture of green fuels. *Halamphora coffeaeformis* contains more aliphatic compounds.

Table 6.3. Distribution of product types generated in bio-oil from microalgae pyrolysis

Process	Temperature [°C]	Microalgae	Conditions	Hydrocarbons [%]	N-Content [%]	Oxygenated [%]	Others	Reference
Fast pyrolysis	600	<i>Scenedesmus sp.</i>		14.13	17.59	19.6	48.52	Experimental data
Pyrolysis	500	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Nutrient-stressed	37.54	5.92	50.9	5.64	(MUSTAPHA et al., 2023)
Pyrolysis	500	<i>Scenedesmus obliquus</i>	unstressed	13.51	47.4	26.58	12.51	(MUSTAPHA et al., 2023)
Pyrolysis in a rotary kiln	335-345	<i>Scenedesmus</i>		9.59	5.08	50.15	26.82	(NYONI; HLANGOTHI; HLABANO-MOYO, 2022)j
Pyrolysis in a rotary kiln	335-345	<i>Spirulina</i>		9.5	4.43	41.85	40.95	(NYONI; HLANGOTHI; HLABANO-MOYO, 2022)
Fast pyrolysis	600	<i>Dunaliella tertiolecta</i>		3.25	7.23	67.67	21.85	(FRANCAVILLA et al., 2015)
Pyrolysis in fixed bed reactor	500	<i>Nannochloropsis</i>	without catalyst	40.32	21.9	5.06	32.2	(AYSU; SANNA, 2015)
Pyrolysis in fixed bed reactor	500	<i>Nannochloropsis</i>	with catalyst	37.49	18.44	12.64	31.43	(AYSU; SANNA, 2015)

Table 6.3 presents the conducted comparison among the primary compound composition of the bio-oil obtained in this study and that of other microalgae. A closer examination of these substances reveals a wide range of distinct organic compounds, the properties of which vary depending on the type of microalgae and the circumstances surrounding the extraction of the bio-oil. Francavilla (2015) investigated the bio-oil obtained from the pyrolysis of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and discovered that the bio-oil contained phenols, aromatics, alcohols, nitrogen-containing compounds, and aliphatic compounds, among a variety of products. As in the current experiment, the pyrolysis of microalgae *Dunaliella tertiolecta* showed a notable number of oxygenated chemicals formed under fast pyrolysis at 600°C.

Aysu (2015) studied bio-oil from the pyrolysis of *Nannochloropsis* in a fixed-bed reactor, contrasting experiments performed at 500°C with and without catalysts. Alkanes and alkenes are aliphatic chemicals produced when microalgae depolymerize saturated and unsaturated fatty acids. These aliphatic compounds contribute to the desirable combustion property. Nitrogen-containing compounds found in bio-oils, such as indoles and nitriles, are produced by the degradation of microalgae proteins. Oxygenated compounds such as alcohols, ketones, and esters were not abundant in these bio-oils. Burned nitrogen in fuels produces unwanted NO_x molecules. Therefore, in order to use microalgae bio-oils as a fuel for transportation, nitrogen must be removed. Hydrodenitrogenation is one suggested technique for reducing the nitrogen content in bio-oils using catalysts.

Even among the same groups, the results of all these studies were remarkably varied from one another. The identification of pyrolysis products changes between authors (identical substances with various names). The results showed that pyrolysis at 500–600°C, in the absence of oxygen, produces oxygenated and nitrogenous compounds that must be reduced. An alternative is the use of catalysts to obtain deoxygenated and denitrogenated biofuel. The growth conditions of the microalgae can alter the composition of its principal constituents (lipids, proteins, and carbohydrates) and may determine the characteristics of pyrolytic products.

6.4 Conclusion

Fast pyrolysis of *Scenedesmus* sp. was carried out in a fluidized-bed reactor at 600°C. The bio-oil produced contains nitrogenous compounds (17.59%), oxygenated compounds (19.76%), and hydrocarbons (14.13%). Nitrogenous compounds included amide, amine, nitrile, and indole. Oxygenated compounds were detected, including acids, esters, phenols, ketones, and aldehydes. The presence of molecules containing O and N inhibits the bio-oil's direct employment as fuel; additional procedures, such as catalytic pyrolysis or other deoxygenation and denitrification procedures, are required. Compounds identified in bio-oil can be isolated for commercial use.

Capítulo 7 - Considerações finais

7.1 Conclusões

A partir dos resultados, conclui-se que é possível cultivar a microalga *Scenedesmus* sp. em fotobiorreatores de baixo custo. A biomassa produzida pode ser separada por sedimentação ou flotação com ar dissolvido, posteriormente, ser seca e submetida à pirólise rápida, resultando em bio-óleo e outros subprodutos de interesse comercial. Adicionalmente, é possível monitorar o teor de lipídios usando o corante Vermelho de Nilo e espectroscopia de fluorescência.

O presente trabalho faz a análise de alternativas tecnológicas que apresentam vantagens em cada etapa da cadeia de produção da microalga *Scenedesmus* sp. até a obtenção de bio-óleo. Nos capítulos 3 a 6 foram analisadas as etapas que correspondem ao cultivo para a produção de biomassa e a obtenção dos compostos presentes na microalga.

A proposta do uso de sacos plásticos como fotobiorreatores de baixo custo apresentou resultados satisfatórios, obtendo biomassa com produtividade máxima de $0,529 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e concentração máxima de $3,723 \text{ g.L}^{-1}$. Não sendo necessário o uso de filtros UV no cultivo de *Scenedesmus* sp.

Foi possível produzir microalgas em meio de cultivo contendo até 40% de vinhaça, e foram definidas as melhores condições para sua colheita utilizando floculante de tanino vegetal combinado com os métodos de sedimentação e flotação com ar dissolvido. Observaram-se valores de recuperação superiores a 97% no caso da sedimentação e eficiências de recuperação superiores a 83% ao utilizar flotação com ar dissolvido.

Além disso, o acompanhamento do conteúdo de lipídios nas microalgas durante o cultivo possui grande importância para determinar o melhor momento em que a microalga pode ser colhida. O método com espectroscopia de fluorescência provou ser robusto e rápido (exigindo menos de 30 minutos).

Como última etapa, a biomassa seca de microalga foi submetida a pirólise rápida a 600°C. O rendimento em bio-óleo foi aproximado a 20%. Na análise dos compostos presentes no bio-óleo, observou-se a presença de compostos nitrogenados (17,59%), compostos oxigenados (19,76%) e hidrocarbonetos (14,13%). Os compostos nitrogenados incluíam amida, amina, nitrila e indol. Já os compostos oxigenados incluíam ácidos, ésteres, fenóis, cetonas e aldeídos.

Com base nestes resultados, propõe-se uma linha de produção da microalga *Scenedesmus* sp., cultivada em efluente (vinhaça), com fotobiorreatores de baixo custo, separação por sedimentação, para a obtenção de bio-óleo por pirólise rápida ou separação de algum composto de interesse comercial.

7.2 Trabalhos futuros

Seguem sugestões para o aprimoramento dos processos propostos neste estudo em trabalhos futuros.

No cultivo, avaliar o uso de fotobiorreatores de baixo custo em volumes maiores, considerando a disponibilidade de sacos plásticos de volumes maiores, que sejam resistentes a vazamentos. Como as sacolas tendem a se deformar, sugere-se instalar um sistema de suporte que permita a passagem de luz no cultivo. Além disso, sugere-se avaliar o efeito da luz solar no cultivo em fotobiorreatores de baixo custo e os efeitos de sombreamento.

Sugere-se desenhar um sistema de separação por sedimentação no qual seja possível automatizar o sistema de agitação e dosificação. Caso seja considerado o uso da flotação com ar dissolvido, sugere-se o escalonamento das células de flotação para utilizar esse método. Em ambos os casos, sugere-se avaliar a reutilização do líquido residual como meio de cultivo de microalga.

Para obtenção de produtos por meio de pirólise rápida, é recomendado examinar o impacto do tamanho das partículas e determinar a temperatura de operação que resulte em maior rendimento de bio-óleo. Considerando a viabilidade da utilização da espectroscopia de fluorescência na determinação do ponto máximo de conteúdo lipídico no cultivo, sugere-se utilizar esse ponto como o momento adequado para a colheita, visando a pirolisação da biomassa e comparar os resultados com os obtidos ao pirolisar biomassa obtida no ponto máximo do crescimento exponencial. Ou estudar as diferentes condições de cultivo e seu efeito na pirólise. Em ambos casos, melhorar na repetitividade do método. Adicionalmente, testar a hipótese de que o uso de catalisadores melhoraria as características do bio-óleo gerado pela pirólise da biomassa de microalga *Scenedesmus* sp.

Referências

ABOMOHR, A. E.-F.; EL-SHEEKH, M.; HANELT, D. Pilot cultivation of the chlorophyte microalga *Scenedesmus obliquus* as a promising feedstock for biofuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 64, p. 237–244, maio 2014.

AHMAD, A.; ASHRAF, S. S. Sustainable food and feed sources from microalgae: Food security and the circular bioeconomy. **Algal Research**, v. 74, p. 103185, 1 jul. 2023.

ALEMÁN-NAVA, G. S. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. **Journal of Microbiological Methods**, v. 128, p. 74–79, 1 set. 2016.

ALI, S. et al. Resource recovery from industrial effluents through the cultivation of microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125461, 1 out. 2021.

ANDRADE, L. et al. *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. **MOJ Food Processing & Technology**, v. 6, p. 00144, 19 jan. 2018a.

ANDRADE, L. A. et al. Characterization and product formation during the catalytic and non-catalytic pyrolysis of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Renewable Energy**, v. 119, p. 731–740, 1 abr. 2018b.

ANP.[Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Dados estatísticos. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo>>. Acesso em: abril 2021.

ARAVIND, S. et al. Conversion of green algal biomass into bioenergy by pyrolysis. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 829–849, 1 maio 2020.

ARUTSELVAN, C. et al. Evaluation of microalgal strains and microalgal consortium for higher lipid productivity and rich fatty acid profile towards sustainable biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 125524, 1 nov. 2021.

AYSU, T.; SANNA, A. Nannochloropsis algae pyrolysis with ceria-based catalysts for production of high-quality bio-oils. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 108–116, 1 out. 2015.

BALDUYCK, L. et al. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 152–158, 1 nov. 2015.

BARCELLOS, B. S. DE C. Imobilização de microalgas em polímeros orgânicos e inorgânico para remoção de nutrientes. 2024.

BATISTA, F. R. M. et al. PROPERTIES OF MICROALGAE OIL FROM THE SPECIES *Chlorella protothecoides* AND ITS ETHYLIC BIODIESEL. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 4, p. 1383–1394, dez. 2018.

BECKER, E. W. Microalgae for Human and Animal Nutrition. Em: **Handbook of Microalgal Culture**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 461–503.

BÉLIGON, V. et al. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**, Food chemistry and biochemistry • Food bioprocessing. v. 7, p. 35–42, 1 fev. 2016.

BENNER, P. et al. Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and

- scalability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 5, p. 791–813, maio 2022.
- BERTOLDI, F. C. et al. Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 85–92, 2007.
- BOSE, A. et al. How to optimise photosynthetic biogas upgrading: a perspective on system design and microalgae selection. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 8, p. 107444, 1 dez. 2019.
- BRASIL. Ministério do Interior. Portaria n.º 158, de 3 de novembro de 1980. Proíbe o lançamento de vinhoto em coleções hídricas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 nov. 1980. Seção 1, p. 1263-1266.
- BRIDGEWATER, A. Biomass fast pyrolysis. **Thermal Science**, v. 8, p. 21–50, 1 jan. 2004.
- BRIDGEWATER, A. V. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. **Biomass and Bioenergy**, Overcoming Barriers to Bioenergy: Outcomes of the Bioenergy Network of Excellence 2003 – 2009. v. 38, p. 68–94, 1 mar. 2012.
- BUTLER, T. O. et al. The transition away from chemical flocculants: Commercially viable harvesting of *Phaeodactylum tricornutum*. **Separation and Purification Technology**, v. 255, p. 117733, jan. 2021.
- CAI, Q. et al. Effective harvesting of *Scenedesmus* using quaternary ammonium chitosan and xanthan gum: Formation of mega flocs with oppositely charged polyelectrolytes. **Journal of Cleaner Production**, v. 329, p. 129730, 20 dez. 2021.
- CAI, W.; LIU, R. Performance of a commercial-scale biomass fast pyrolysis plant for bio-oil production. **Fuel**, v. 182, p. 677–686, 15 out. 2016.
- CASTRILLO, M. et al. High pH-induced flocculation–sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 324–329, 1 jan. 2013.
- CETESB. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 3ª ed. **São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**, 2015. 15 p.
- CHANG, H.-X. et al. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 231–238, 1 abr. 2016.
- CHAPMAN, R. L. Algae: the world’s most important “plants”—an introduction. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 5–12, jan. 2013.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Continuous flocculation–sedimentation for harvesting *Nannochloropsis salina* biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 94–103, 20 mar. 2016.
- CHEN, C.-Y.; NAGARAJAN, D.; CHEAH, W. Y. Eicosapentaenoic acid production from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using deep sea water in outdoor plastic-bag type photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 1–7, abr. 2018.
- CHEN, W.-H. et al. Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: A review. **Bioresource Technology**, Advances in biofuels and chemicals from algae. v. 184, p. 314–327, 1 maio 2015.

CHEN, Y.; YAO-HSIN, H.; HUANG, H. Different plastic-bag type photobioreactor for biomass production of *Chlorella* species. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1113, p. 012004, 1 mar. 2021.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, maio 2007.

CHU, H. et al. Metabolomics reveals a lipid accumulation mechanism involving carbon allocation in *Scenedesmus obliquus* under norfloxacin stress. **Renewable Energy**, v. 157, p. 585–592, 1 set. 2020.

COMAS GONZÁLEZ, A. A. Las interpretaciones de los taxones, un de los problemas de la taxonomía tradicional. Caso: *Scenedesmus sensu lato* (Sphaeropleales, Chlorophyceae). v. 6, n. 3, p. 139–150, 2020.

COSTA, J. A. DA et al. Genomic prediction with the additive-dominant model by dimensionality reduction methods. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 7 dez. 2020.

DA FONTOURA, J. T. et al. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 111, p. 355–362, 1 out. 2017.

DAFNOPATIDOU, E. K.; LAZARIDIS, N. K. Dyes Removal from Simulated and Industrial Textile Effluents by Dissolved-Air and Dispersed-Air Flotation Techniques. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 15, p. 5594–5601, 1 ago. 2008.

DE MORAIS, E. G. et al. Biomass valorization via pyrolysis in microalgae-based wastewater treatment: Challenges and opportunities for a circular bioeconomy. **Journal of Applied Phycology**, 13 out. 2023.

DOUŠKOVÁ, I. et al. Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 3, p. 606–611, 1 mar. 2010.

DU, H. et al. Autocatalytic co-upgrading of biochar and pyrolysis gas to syngas. **Energy**, v. 221, p. 119837, 15 abr. 2021.

EIDA, M. F.; DARWESH, O. M.; MATTER, I. A. Cultivation of Oleaginous Microalgae *Scenedesmus obliquus* on Secondary Treated Municipal Wastewater as Growth Medium for Biodiesel Production. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, n. 5, p. 38–51, 1 set. 2018.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Detrimental effect of UV-B radiation on growth, photosynthetic pigments, metabolites and ultrastructure of some cyanobacteria and freshwater chlorophyta. **International Journal of Radiation Biology**, v. 97, n. 2, p. 265–275, 1 fev. 2021.

ESPINOZA-GALLARDO, D.; CONTRERAS-PORCIA, L.; EHRENFELD, N. β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). **Revista de biología marina y oceanografía**, v. 52, n. 1, p. 33–49, abr. 2017.

FERNANDES, A. S. et al. HPLC-PDA-MS/MS as a strategy to characterize and quantify natural pigments from microalgae. **Current Research in Food Science**, v. 3, p. 100–112, 1 nov. 2020.

FINEP. Financiadora de Estudos e Projetos. Brasil domina tecnologia que transforma vinhaça em biogás. Disponível em: <<http://finep.gov.br/noticias/todas-noticias/5935-brasil-domina-tecnologia-que-transf-orma-vinhaca-em-biogas>>. Acesso em: setembro 2021.

FONSECA, N. et al. Thermal and Catalytic Fast Pyrolysis of Oily Extracts of Microalgae: Production of Biokerosene. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2021.

FRANCAVILLA, M. et al. Cascading microalgae biorefinery: Fast pyrolysis of *Dunaliella tertiolecta* lipid extracted-residue. **Algal Research**, v. 11, p. 184–193, 1 set. 2015.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, 1 dez. 2014.

GALARZA, V. O. Carbohydrates and proteins in microalgae: potential functional foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

GARCÍA, J.; VICENTE, M.; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, v. 10, 15 ago. 2017.

GARG, S.; WANG, L.; SCHENK, P. M. Effective harvesting of low surface-hydrophobicity microalgae by froth flotation. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 437–441, 1 maio 2014.

GAUTAM, R.; VARMA, A. K.; VINU, R. Apparent Kinetics of Fast Pyrolysis of Four Different Microalgae and Product Analyses Using Pyrolysis-FTIR and Pyrolysis-GC/MS. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 11, p. 12339–12349, 16 nov. 2017.

GAUTAM, R.; VINU, R. Unraveling the interactions in fast co-pyrolysis of microalgae model compounds via pyrolysis-GC/MS and pyrolysis-FTIR techniques. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 2, p. 278–297, 4 fev. 2019.

GEBREEYESSUS, G. D.; MEKONNEN, A.; ALEMAYEHU, E. A review on progresses and performances in distillery stillage management. **Journal of Cleaner Production**, v. 232, p. 295–307, 20 set. 2019.

GERARDO, M. L. et al. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. **Algal Research**, v. 11, p. 248–262, 1 set. 2015.

GEREMIA, E. et al. A Review about Microalgae Wastewater Treatment for Bioremediation and Biomass Production—A New Challenge for Europe. **Environments**, v. 8, n. 12, p. 136, dez. 2021.

GHEDA, S. F.; ISMAIL, G. A. Natural products from some soil cyanobacterial extracts with potent antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 2, p. e20190934, 2020.

GOVENDER, T. et al. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence

method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 507–511, 1 jun. 2012.

GRIS, L. R. S. et al. Laboratory apparatus to evaluate microalgae production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 3, p. 487–497, set. 2013.

GUPTA, P. L.; LEE, S.-M.; CHOI, H.-J. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 1409–1417, 1 set. 2015.

GUPTA, V. K.; RASTOGI, A. Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 1, p. 407–414, 21 mar. 2008.

GUSBETH, C. et al. Fluorescence Diagnostics for Lipid Status Monitoring of Microalgae during Cultivation. **International Journal of Renewable Energy & Biofuels**, p. 1–10, 3 mar. 2016.

HAHLADAKIS, J. N. et al. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 179–199, 15 fev. 2018.

HAMMED, A. M. et al. Growth regime and environmental remediation of microalgae. **Algae**, v. 31, n. 3, p. 189–204, 30 set. 2016.

HARMAN-WARE, A. E. et al. Microalgae as a renewable fuel source: Fast pyrolysis of *Scenedesmus* sp. **Renewable Energy**, v. 60, p. 625–632, 1 dez. 2013.

HARTMANN, P. et al. **A dynamic model coupling photoacclimation and photoinhibition in microalgae**. 2013 European Control Conference (ECC). **Anais...** Em: 2013 EUROPEAN CONTROL CONFERENCE (ECC). jul. 2013. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/6669381>>. Acesso em: 26 nov. 2023

HE, M. et al. Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15526, 14 nov. 2017.

HIDALGO, K. et al. Utilization of distillery vinasse as additive of broiler chickens. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 43, p. 273–276, 1 jan. 2009.

HLADIKOVA MARTINA; SULC RADEK. Selection of a Separation Method Used for Harvesting of Microalgae from Aqueous Solutions. **Chemical Engineering Transactions**, v. 86, p. 157–162, jun. 2021.

HOUNSLOW, E. et al. Lipid quantification techniques for screening oleaginous species of microalgae for biofuel production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 2, p. 1500469, 2017.

HU, Z. et al. Bio-oil production through pyrolysis of blue-green algae blooms (BGAB): Product distribution and bio-oil characterization. **Energy**, v. 52, p. 119–125, 1 abr. 2013.

HUANG, J. J. et al. Enhancement of the Production of Bioactive Microalgal Metabolites by Ultraviolet Radiation (UVA 365 nm). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10215–10224, 3 out. 2018.

HUANG, J. J.; CHEUNG, P. C.-K. +UVA treatment increases the degree of unsaturation in

microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyceae). **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 783–791, 1 dez. 2011.

HUANG, Q. et al. Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. **Engineering**, v. 3, n. 3, p. 318–329, jun. 2017.

ISHAQ, A.; PERALTA, H. M.; BASRI, H. Bioactive Compounds from Green Microalga – *Scenedesmus* and its Potential Applications: A Brief Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 39, p. 1–16, 1 fev. 2016.

ISMAIL, M.; ELKOMY, R. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Various Marine Microalgae and Cyanobacteria. **Hydrobiological Journal**, v. 58, n. 1, 2022.

JANSSEN, M. Chapter Four - Microalgal Photosynthesis and Growth in Mass Culture. Em: LEGRAND, J. (Ed.). **Advances in Chemical Engineering**. Photobioreaction Engineering. [s.l.] Academic Press, 2016. v. 48p. 185–256.

JAYARAMAN, K.; ALAGUMURTHI, N. PERFORMANCE AND EMISSION CHARACTERISTICS OF ALGAE BIO-FUELLED DIESEL ENGINE. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 4, p. 2973–2980, 1 jan. 2016.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 36, 5 mar. 2018.

KIM, S. W.; KOO, B. S.; LEE, D. H. A comparative study of bio-oils from pyrolysis of microalgae and oil seed waste in a fluidized bed. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 96–102, 1 jun. 2014.

KONG, F. et al. Semi-continuous lipid production and sedimentation of *Scenedesmus* sp. by metal ions addition in the anaerobic fermentation effluent. **Energy Conversion and Management**, v. 203, 1 jan. 2020.

KRZEMIŃSKA, I. et al. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 4, p. 735–741, 1 abr. 2014.

KUMAR, N.; BANERJEE, C.; JAGADEVAN, S. Identification, characterization, and lipid profiling of microalgae *Scenedesmus* sp. NC1, isolated from coal mine effluent with potential for biofuel production. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00621, 1 jun. 2021.

KUMAR, V. et al. The effects of ultraviolet radiation on growth, biomass, lipid accumulation and biodiesel properties of microalgae. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 40, n. 7, p. 787–793, 3 abr. 2018.

LAMA, S. et al. Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 464–470, 1 nov. 2016.

LAZZARI, E. et al. Classification of biomass through their pyrolytic bio-oil composition using FTIR and PCA analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 856–864, 1 jan. 2018.

LEITE, L. DE S.; DOS SANTOS, P. R.; DANIEL, L. A. Microalgae harvesting from wastewater by pH modulation and flotation: Assessing and optimizing operational parameters. **Journal of Environmental Management**, v. 254, p. 109825, 15 jan. 2020.

LEITE, L. DE S.; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Coagulation and dissolved air flotation as a harvesting method for microalgae cultivated in wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, p. 100947, 1 dez. 2019.

LI, P.; LIN, J. Effect of ultraviolet radiation on photosynthesis, biomass, and fatty acid content and profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 316–322, maio 2012.

LI, X. et al. Microwave pyrolysis coupled with conventional pre-pyrolysis of the stalk for syngas and biochar. **Bioresource Technology**, v. 348, p. 126745, 1 mar. 2022.

LIMA, S. et al. Autochthonous microalgae grown in municipal wastewaters as a tool for effectively removing nitrogen and phosphorous. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101647, 1 dez. 2020.

LIU, S. et al. Improving Cell Growth and Lipid Accumulation in Green Microalgae *Chlorella* sp. via UV Irradiation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 7, p. 3507–3518, abr. 2015.

LOPES, A. P. et al. Outdoor Cultivation of the Microalga *Chlorella vulgaris* in a New Photobioreactor Configuration: The Effect of Ultraviolet and Visible Radiation. **Energies**, v. 13, n. 8, p. 1962, jan. 2020.

LOURENÇO, S. DE O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. [s.l.: s.n.].

MAHARANI, D. K. et al. The effect of photoperiod on lipid production of mixed culture *Arthrospira maxima* Setchell et Gardner and microalgae consortium of Glagah isolate. **AIP Conference Proceedings**, v. 2260, n. 1, p. 040012, 16 set. 2020.

MANGRICH, A. S. et al. Green chemistry in water treatment: Use of coagulant derived from acacia mearnsii tannin extracts. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2–15, 2014.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. Em: **Encyclopedia of Ecology**. [s.l.: s.n.]. p. 2226–2235.

MATA, T. M. et al. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 151–158, mar. 2012.

MATHIMANI, T.; MALLICK, N. A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel – Key challenges and future directions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 1103–1120, 1 ago. 2018.

MATOS, Â. P. Advances in Microalgal Research in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 12 maio 2021.

MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 165–178, 1 jun. 2013.

MIRANDA, J.; PASSARINHO, P.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass

production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, p. 555–64, 17 ago. 2012.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 12–25, 15 abr. 2009.

MONTIEL-ROSALES, A. et al. Post-Industrial Use of Sugarcane Ethanol Vinasse: A Systematic Review. 2022.

MUSTAPHA, S. I. et al. Catalytic pyrolysis of nutrient-stressed *Scenedesmus obliquus* microalgae for high-quality bio-oil production. **Renewable Energy**, v. 179, p. 2036–2047, 1 dez. 2021.

MUSTAPHA, S. I. et al. Production of high-quality pyrolytic bio-oils from nutrient-stressed *Scenedesmus obliquus* microalgae. **Fuel**, v. 332, p. 126299, 15 jan. 2023.

MUTANDA, T. et al. Biotechnological Applications of Microalgal Oleaginous Compounds: Current Trends on Microalgal Bioprocessing of Products. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, 2020.

MUTANDA, T.; KARTHIKEYAN, S.; BUX, F. The Utilization of Post-chlorinated Municipal Domestic Wastewater for Biomass and Lipid Production by *Chlorella* spp. Under Batch Conditions. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 164, p. 1126–1138, 1 fev. 2011.

NATUNEN, K. et al. Nile Red staining of phytoplankton neutral lipids: species-specific fluorescence kinetics in various solvents. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1161–1168, 1 jun. 2015.

NAYAK, J. K.; GHOSH, U. K. Post treatment of microalgae treated pharmaceutical wastewater in photosynthetic microbial fuel cell (PMFC) and biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 131, p. 105415, 1 dez. 2019.

NDIKUBWIMANA, T. et al. Flotation: A promising microalgae harvesting and dewatering technology for biofuels production. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 3, p. 315–326, 2016.

NIAGHI, M.; A. MAHDAVI, M.; GHESHLAGHI, R. Optimization of dissolved air flotation technique in harvesting microalgae from treated wastewater without flocculants addition. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 7, p. 013130, 1 jan. 2015.

NICCOLAI, A. et al. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. **Algal Research**, v. 42, p. 101617, 1 set. 2019.

NIU, Q.; PRINS, W.; RONSSE, F. Microalgae fractionation and pyrolysis of extracted microalgae biopolymers. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 172, p. 106000, 1 jun. 2023.

NOLL, P.; HENKEL, M. History and Evolution of Modeling in Biotechnology: Modeling & Simulation, Application and Hardware Performance. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3309–3323, 1 jan. 2020.

NYONI, B.; HLANGOTHI, S. P. **Comparison of Oils from the Low Temperature Pyrolysis of Algal Biomass and Bituminous Coal in a Rotary Kiln**. 2022 11th International

Conference on Renewable Energy Research and Application (ICRERA). **Anais...** Em: 2022 11TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON RENEWABLE ENERGY RESEARCH AND APPLICATION (ICRERA). set. 2022. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/9922781>>. Acesso em: 30 out. 2023

NYONI, B.; HLANGOTHI, S. P.; HLABANO-MOYO, B. M. Analysis of pyrolysis process for Spirulina and Scenedesmus microalga in a rotary kiln and the composition of their resultant bio-oils. **International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)**, v. 12, n. 3, p. 1383–1392, 24 set. 2022.

OLIVEIRA, Á. S. DE et al. Study of the volatile profile of the microalgal biomass of Chlorella vulgaris / Estudo do perfil volátil da biomassa microalgal de Chlorella vulgaris. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 53630–53646, 7 jun. 2021.

OREJUELA-ESCOBAR, L. et al. Prospects of Microalgae for Biomaterial Production and Environmental Applications at Biorefineries. **Sustainability**, v. 13, n. 6, p. 3063, jan. 2021.

PATEL, A. et al. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art. **BMC Chemical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 13, 5 jun. 2019.

PENA, A. DE C. C. et al. Consortium of Microalgae for Tannery Effluent Treatment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19170518, 13 jun. 2019.

PERVEEN, K. et al. Antifungal potential, chemical composition of Chlorella vulgaris and SEM analysis of morphological changes in Fusarium oxysporum. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2501–2505, 1 abr. 2022.

PETRUK, G. et al. Simultaneous production of antioxidants and starch from the microalga Chlorella sorokiniana. **Algal Research**, v. 34, p. 164–174, 1 set. 2018.

PŁACZEK, M.; PATYNA, A.; WITCZAK, S. Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation. **E3S Web of Conferences**, v. 19, p. 02032, 2017.

PRAKASH, A.; SAHA, H. Biodiesel Production from Microalgae and A Comparative Study of Bioreactors: A Scope of Replacing the Petroleum Based Fuels. p. 4, 2013.

PRAZERES, A. R. et al. Treatment of vinasse from sugarcane ethanol industry: H₂SO₄, NaOH and Ca(OH)₂ precipitations, FeCl₃ coagulation-flocculation and atmospheric CO₂ carbonation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 4, p. 103203, 1 ago. 2019.

PUGAZHENDHI, A. et al. Biodiesel from Scenedesmus species: Engine performance, emission characteristics, corrosion inhibition and bioanalysis. **Fuel**, v. 276, p. 118074, 15 set. 2020.

RAJKUMAR, R.; YAAKOB, Z.; TAKRIFF, M. S. Potential of Micro and Macro Algae for Biofuel Production: A Brief Review. **BioResources**, v. 9, n. 1, p. 1606–1633, 2 dez. 2013.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae Scenedesmus sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630–635, out. 2014.

RANZAN, C. et al. Wheat flour characterization using NIR and spectral filter based on

Ant Colony Optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 132, p. 133–140, 15 mar. 2014.

RANZAN, C. et al. Sulfur Determination in Diesel using 2D Fluorescence Spectroscopy and Linear Models. **IFAC-PapersOnLine**, 9th IFAC Symposium on Advanced Control of Chemical Processes ADCHEM 2015. v. 48, n. 8, p. 415–420, 1 jan. 2015.

RANZAN, L. et al. Avoiding misleading predictions in fluorescence-based soft sensors using autoencoders. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 223, p. 104527, 15 abr. 2022.

RAYMUNDO, L. M. **Desenvolvimento de uma planta laboratorial de pirólise rápida em leite fluidizado aplicado à casca de arroz**. 2016.

RAYMUNDO, L. M. et al. Online Separation of Biomass Fast-Pyrolysis Liquids via Fractional Condensation. **Energy & Fuels**, 14 out. 2022.

REN, H.-Y. et al. Improved Nile red staining of *Scenedesmus* sp. by combining ultrasonic treatment and three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. **Algal Research**, v. 7, p. 11–15, 1 jan. 2015.

REYES, J. F.; LABRA, C. Biomass harvesting and concentration of microalgae *scenedesmus* sp. cultivated in a pilot photobioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 87, p. 78–83, 1 abr. 2016.

RIZZI, J. Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas. 28 maio 2010.

ROCHA, D. N. et al. Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121644, 1 out. 2019.

ROMERO-VILLEGAS, G. I. et al. Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at pilot-scale in flat-panel photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 284, p. 102–114, 20 out. 2018.

ROSTRON, K. A.; LAWRENCE, C. L. Nile Red Staining of Neutral Lipids in Yeast. Em: PELLICCIARI, C.; BIGGIOGERA, M. (Eds.). **Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2017. p. 219–229.

RUIZ, J. et al. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy. **Algal Research**, v. 64, p. 102698, 1 maio 2022.

RUMIN, J. et al. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 42, 12 mar. 2015.

SÁ, M. et al. 2D Fluorescence spectroscopy for monitoring *Dunaliella salina* concentration and integrity during membrane harvesting. **Algal Research**, v. 24, p. 325–332, 1 jun. 2017.

SÁ, M. et al. Monitoring of eicosapentaenoic acid (EPA) production in the microalgae *Nannochloropsis oceanica*. **Algal Research**, v. 45, p. 101766, 1 jan. 2020.

SACRISTÁN DE ALVA, M. et al. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes. **Algal Research**, v. 34, p. 97–103, 1 set. 2018.

SALGUERO, A. et al. UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 506–511, fev. 2005.

SANTOS, P. S. et al. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118005, 10 dez. 2019a.

SANTOS, P. V. J. L. et al. K-RANK: AN EVOLUTION OF Y-RANK FOR MULTIPLE SOLUTIONS PROBLEM. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 409–419, 15 jul. 2019b.

SAYEDIN, F. et al. Microalgae cultivation in thin stillage anaerobic digestate for nutrient recovery and bioproduct production. **Algal Research**, v. 47, p. 101867, 1 maio 2020.

SCOPUS. Scopus: abstract and citation database. Disponível em: <<https://www.scopus.com>>. Acesso em: maio 2022.

SHAIKH, S. M. R. et al. A comprehensive review on harvesting of microalgae using Polyacrylamide-Based Flocculants: Potentials and challenges. **Separation and Purification Technology**, v. 277, p. 119508, 15 dez. 2021.

SHEN, Q.; WU, H. Rapid pyrolysis of biochar prepared from slow and fast pyrolysis: The effects of particle residence time on char properties. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 39, n. 3, p. 3371–3378, 1 jan. 2023.

SHIRAZI, Y.; VIAMAJALA, S.; VARANASI, S. In situ and Ex situ Catalytic Pyrolysis of Microalgae and Integration With Pyrolytic Fractionation. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 2020.

SILVA, M. A. S. DA; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 108–114, fev. 2007.

SIRAJUNNISA, A. R.; SURENDRHIRAN, D. Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 248–267, 1 dez. 2016.

ŞIRIN, S.; SILLANPÄÄ, M. Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 79–87, 1 set. 2015.

STEIN, J. R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. 1 jan. 1973.

SUBAGYONO, R. R. D. J. N. et al. Catalytic Pyrolysis of the Green Microalgae *Botryococcus braunii* over Ni/SBA-15 Prepared by the Ultrasonic-Assisted Sol-Gel Method. **ACS Omega**, v. 8, n. 9, p. 8582–8595, 7 mar. 2023.

TAKAHASHI, M. B. et al. Artificial neural network associated to UV/Vis spectroscopy for monitoring bioreactions in biopharmaceutical processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1045–1054, 1 jun. 2015.

TEMPLETON, D. W. et al. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 225–234, 28 dez. 2012.

THEIN, C. K. et al. Optimization of Plastic Bag for Algae Growth. p. 3, 2014.

TORAMAN, H. E. et al. Quantitative analysis of nitrogen containing compounds in microalgae based bio-oils using comprehensive two-dimensional gas-chromatography coupled to nitrogen chemiluminescence detector and time of flight mass spectrometer. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 135–146, 19 ago. 2016.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; THAKUR, I. S. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774–781, 1 fev. 2015.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLEAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233–239, 1 abr. 2013.

VANTHOOR-KOOPMANS, M. et al. Microalgae and Cyanobacteria Production for Feed and Food Supplements. Em: GUEVARA-GONZALEZ, R.; TORRES-PACHECO, I. (Eds.). **Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 253–275.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7–11, 1 fev. 2013.

WANG, J.-H. et al. Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 331–342, 1 set. 2018.

WANG, T. et al. Rapid identification and quantification of cheaper vegetable oil adulteration in camellia oil by using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 293, p. 348–357, 30 set. 2019.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63–102, 1 ago. 2000.

WOLF, G. et al. Application of Coagulation/Flocculation Process of Dairy Wastewater from Conventional Treatment Using Natural Coagulant for Reuse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 2041–2046, 20 maio 2015.

WONG, J. F. et al. A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 5, p. 1156–1170, 1 set. 2022.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 1 jul. 2010.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature.

Bioresource Technology, v. 102, n. 3, p. 3098–3102, 1 fev. 2011.

XU, Y. et al. The Draft Genome of *Hariotina reticulata* (Sphaeropleales, Chlorophyta) Provides Insight into the Evolution of Scenedesmaceae. **Protist**, v. 170, n. 6, p. 125684, 1 dez. 2019.

YANG, C. et al. Pyrolysis of microalgae: A critical review. **Fuel Processing Technology**, v. 186, p. 53–72, 1 abr. 2019.

YANG, Z.; HOU, J.; MIAO, L. Harvesting freshwater microalgae with natural polymer flocculants. **Algal Research**, v. 57, p. 102358, jul. 2021.

YAO, L. et al. Microalgae lipid characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1773–1787, 18 fev. 2015.

YIN, Z. et al. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122804, 1 abr. 2020.

ZHANG, X. et al. Effect of enhanced UV-B radiation on photosynthetic characteristics of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 469, p. 27–35, 1 ago. 2015.

ZHANG, Y.; JIANG, H.-B.; QIU, B.-S. Effects of UVB Radiation on competition between the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the Chlorophyceae *Chlamydomonas microspheara*(1). **Journal of Phycology**, v. 49, n. 2, p. 318–328, abr. 2013.

ZHANG, Z. et al. Bacterial-algal coupling system for high strength mariculture wastewater treatment: Effect of temperature on nutrient recovery and microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 338, p. 125574, 1 out. 2021.

ZHU, H. et al. Plastic bag as horizontal photobioreactor on rocking platform driven by water power for culture of alkalihalophilic cyanobacterium. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 46, dez. 2017.

ZHU, J.; RONG, J.; ZONG, B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, n. 1, p. 80–100, jan. 2013.

ZOU, X. et al. Microalgae harvesting by buoy-bead flotation process using Bioflocculant as alternative to chemical Flocculant. **Algal Research**, v. 32, p. 233–240, 1 jun. 2018.