UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MATEUS DE SOUZA AMARAL

Cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel

LORENA

2018

MATEUS DE SOUZA AMARAL

Cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Coorientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

Versão Corrigida

Lorena
2018

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

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

Amaral, Mateus de Souza
Cultivo da microalga marinha Chlorella minutissima em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel / Mateus de Souza Amaral; orientador Arnaldo Márcio Ramalho Prata; co-orientador Messias Borges Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
151 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Fotobiorreator integrado. 2. Chlorella minutissima. 3. Lipídeos. 4. Perfil de ácidos graxos. 5. Biodiesel. I. Título. II. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho, orient. III. Silva, Messias Borges, co orient.

Dedico este trabalho à minha mãe,

Maria Lúcia Gonçalves de Souza Amaral,

ao meu pai, Osvaldo do Amaral

e minha irmã Caroline de Souza Amaral,

por todo o tempo meu que deles fora privado,

embora a distância nunca tenha impedido que caminhássemos o tempo todo lado a lado.

À minha esposa Ana Paula Mendes de Almeida, por toda a compreensão, paciência e amor,

pois teria sido difícil sem ela.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Osvaldo do Amaral e Maria Lúcia Gonçalves de Souza Amaral, pelo essencial, fundamental e eterno apoio;

À minha esposa Ana Paula Mendes de Almeida, pela parceria, companheirismo e irrestrito apoio.

À minha irmã Caroline de Souza Amaral, pela força e torcida.

Ao orientador Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela maestria, ajuda e atenção cedida.

Ao co-orientador Prof. Dr. Messias Borges Silva, pelo convite à vida de pesquisador desde o mestrado, pelo companheirismo, suporte e ensinamentos.

Às professoras Drª. Heizir Ferreira de Castro e Larissa de Freitas, por toda ajuda e ensinamentos.

Aos amigos e companheiros do laboratório de engenharia de microalgas,

Guilherme Arantes Pedro, Savienne Zorn, Eduardo Bredda, Victor Marino e Bruno Contesini, por tornar os dias mais leves e descontraídos durante o trabalho.

Aos amigos Cristiano Reis, Ana Karine e Sara Machado por toda a ajuda cedida.

Aos membros da banca:

Profª. Drª. Carla Cristina Almeida Loures,

Profª. Drª.Patrícia Caroline Molgero da Rós,

Prof. Dr. Fabiano Luiz Naves,

Prof. Dr. Júlio César dos Santos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram para que este trabalho se concretizasse, muito obrigado!

RESUMO

AMARAL, M. S. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel**. 2018. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2018.

A busca por uma fonte de matéria prima renovável alternativa aos combustíveis fósseis tem impulsionado o desenvolvimento de novas fontes de biomassa para os biocombustíveis. Uma fonte de biomassa alternativa que vêm ganhando destaque são as microalgas, micro-organismos fotossintéticos capazes de capturar o CO_2 atmosférico e acumular altos teores de lipídeos em sua biomassa, tornando-os muito atrativos como matéria-prima para a síntese de biodiesel. Nesse sentido, muitos trabalhos têm sidos conduzidos para o desenvolvimento dos mais variados tipos de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas. Assim, o presente trabalho propôs um fotobiorreator integrado (coluna de bolhas e tubular), internamente iluminado com luz de LED, para estudar os efeitos dos fatores: cor da iluminação, fotoperíodo, aeração e vazão de circulação de meio, no cultivo foto-autotrófico da microalga marinha *Chlorella minutissima* em duas fases, utilizando o planejamento estatístico de Taguchi (L_9), com vistas à formação de biomassa e ao acúmulo de lipídeos nessa microalga, para a produção de biodiesel. Foi alcançada a máxima concentração de biomassa de 506 mg L^{-1} e a máxima produtividade volumétrica de biomassa de 62,5 mg L^{-1} com 20,2 % de lipídeos para o cultivo da *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado internamente iluminado com a cor azul, em fotoperíodo de 24 h diárias de iluminação, provido com 0,5 vvm de aeração e 5,1 L min^{-1} de vazão de recirculação de meio de cultivo. O perfil dos ácidos graxos presentes no extrato lipídico da *Chlorella minutissima* apresentou predominância de ácidos graxos saturados, com destaque para o ácido palmítico (C 16 : 0), com 59,49 %, 57,28 % e 46,5 %, nos cultivos iluminados com as cores, branco, vermelho e azul, respectivamente. A partir dos lipídeos extraídos, atingiu-se 96,6 % de conversão em biodiesel utilizando etanol via catálise ácida com ácido sulfúrico (10 % m / m) durante 8 h de reação à 80 ˚C.

Palavras-chave: Fotobiorreator integrado. *Chlorella minutissima*. Lipídeos. Perfil de ácidos graxos. Biodiesel.

ABSTRACT

AMARAL, M. S. **Cultivation of the marine microalgae *Chlorella minutissima* in integrated photobioreactor (bubble column – tubular) in order to obtain biomass for the biodiesel production**. 2018. 151 p. Thesis (Doctoral of Science) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2018.

The search for a renewable source alternative to fossil fuels has driven the development of new sources of biomass for biofuels. An alternative source of biomass that have come to prominence are microalgae, photosynthetic micro-organisms capable of capturing atmospheric CO_2 and accumulating high levels of lipids in their biomass, making them very attractive as a raw material for biodiesel synthesis. In this way, many studies have been conducted for the development of the many types of photobioreactors for the cultivation of microalgae. Thus, the present work proposed an integrated photobioreactor (bubble and tubular column), internally illuminated with LED light, to study the effects of the factors: illumination color, photoperiod, aeration and culture medium recirculation flow rate, in photo-autotrophic cultivation of the *Chlorella minutissima*, in two phases, using design of the experiment (Taguchi - L9), aiming the biomass production and lipid accumulation, for the biodiesel production. The maximum biomass concentration of 506 mg L^{-1} and the maximum biomass volumetric productivity of 62.5 mg L^{-1} with 20.2% of lipids were obtained with the cultivation of *Chlorella minutissima* in the integrated photobioreactor internally with blue illumination, 24h of photoperiod, 0.5 vvm of aeration and 5.1 L min^{-1} of culture medium recirculation flow rate. The fatty acids profile present in the lipid extract of *Chlorella minutissima* showed a predominance of saturated fatty acids, with emphasis on palmitic acid (C 16: 0), with 59.49%, 57.28% and 46.5%, to cultivations illuminated with white, red and blue, respectively. From the extracted lipids, 96.6% were converted in biodiesel via acid catalysis using ethanol with sulfuric acid (10% w / w) for 8 h of reaction at 80 ° C.

Keywords: Integrated photobioreactor. *Chlorella minutissima*. Lipds. Fatty acid profile. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Distribuição da contribuição por setor na emissão antropogênica de CO_2 na atmosfera. 22

Figura 2.2 - Percentual representativo das matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil. 23

Figura 2.3 - Distribuição das empresas produtoras de biodiesel no Brasil. 24

Figura 2.4 - Comparação dos custos de produção para biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração. 26

Figura 2.5 - Processo conceitual para a produção de biocombustível a partir de biomassa microalgal 27

Figura 2.6 - Grupos mais abundantes de microalgas 28

Figura 2.7 - Variação da biomassa em função do tempo num cultivo de microalgas em modo descontínuo 38

Figura 2.8- Imagem de dois tipos de tanques abertos. Circular pond-(A) e racewaypond-(B) 39

Figura 2.9 - Desenho esquemático de uma "raceway pond". 40

Figura 2.10 - Desenho esquemático de três fotobiorreatores coluna de bolhas utilizados para o cultivo da microalga *Chlorella minutissima*. 40

Figura 2.11 - Desenho esquemático de modelos "airlift": cilindro concêntrico (A) e cilindro bipartido (B). 41

Figura 2.12 - Esquema e imagem de fotobiorreator do tipo flat-plate. 42

Figura 2.13 - Foto de um Fotobiorreator tubular horizontal. 42

Figura 2.14 - Esquema de um Fotobiorreator tubular inclinado 43

Figura 2.15 - Esquema de um Fotobiorreator tubular helicoidal. 43

Figura 2.16 - Esquema de um Fotobiorreator tubular vertical conectado a um biorreator de coluna de bolhas. 44

Figura 2.17 - Esquema de um Fotobiorreator tubular horizontal ligado a tanques abertos. 44

Figura 2.18 - Desenho esquemático de um biorreator tipo tanque agitado 45

Figura 2.19 - Imagem de fotobiorreator tipo "bag". 46

Figura 2.20 - Esquema de um Fotobiorreator tubular em formato de serpentina.....46

Figura 2.21 - Esquema de um Fotobiorreator tubular espelhado em formato de serpentina. 47

Figura 2.22 - Esquema e fotos de um Fotobiorreator flutuador rotativo 47

Figura 2.23 - Imagem de um Fotobiorreator de coluna de bolhas com discos internos 48

Figura 2.24 - Esquema de um fotobiorreator horizontal associado com um biorreator tipo *airlift*.....48

Figura 2.25 - Esquema e imagem de um Fotobiorreator integrado a uma construção. 49

Figura 2.26 - Polarização de um dispositivo LED.....53

Figura 2.27 - Esquema e imagem dos Fotobiorreatores iluminados por luzes de LED para o cultivo de Botryococcus braunii. 54

Figura 2.28 - Reação de transesterificação pela qual se obtém os ésteres do biodiesel. 61

Figura 2.29 - Esquema de reação de esterificação via catálise ácida.....62

Figura 4.1 - Desenho esquemático da configuração coluna de bolhas que compõe o fotobiorreator integrado internamente iluminado. 66

Figura 4.2 - Desenho esquemático da configuração tubular que compõe o fotobiorreator integrado (A), com detalhe da iluminação interna dentro do tubo menor (B). 67

Figura 4.3 - Ilustração esquemática do fotobiorreator integrado internamente iluminado usado para o cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.....68

Figura 4.4 - Sistema com os três fotobiorreatores integrados internamente iluminados: (A) antes e (B) durante cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.....68

Figura 5.1 - Concentração celular em função do tempo, durante as duas fases do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto para cada condição experimental do planejamento de Taguchi. 77

Figura 5.2 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 1.....78

Figura 5.3 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 2.....78

Figura 5.4 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 3.....79

Figura 5.5 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 4. 80

Figura 5.6 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 5. 80

Figura 5.7 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 6. 81

Figura 5.8 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de Chlorella *minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 7 82

Figura 5.9 - Concentração celular X (- ■ -) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de Chlorella *minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 8. 82

Figura 5.10 - Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de Chlorella *minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 9. 83

Figura 5.11 - Concentração máxima de biomassa X (■) e produtividade volumétrica P (—) de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, para cada condição experimental do planejamento de Taguchi, durante a fase 1. 84

Figura 5.12 - Teor de lipídeos L (■) e produtividade lipídica PL (—) de Chlorella *minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, para cada condição experimental do planejamento de Taguchi, durante a fase 1. 85

Figura 5.13 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 1. 86

Figura 5.14 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 2. 86

Figura 5.15 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 3. 87

Figura 5.16 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 4. 88

Figura 5.17 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 5. 88

Figura 5.18 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 6. 89

Figura 5.19 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 7 90

Figura 5.20 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 8. 90

Figura 5.21 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 9. 91

Figura 5.22 - Concentrações de biomassa (X) obtidas ao final de cada fase do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* ao final de cada fase do experimento realizado, de acordo com o planejamento de Taguchi. 92

Figura 5.23 - Teores de lipídeos na biomassa (L) obtidos ao final de cada fase do cultivo de *Chlorella minutissima* para cada experimento realizado, de acordo com o planejamento de Taguchi.....92

Figura 5.24 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 94

Figura 5.25 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a produtividade volumétrica de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 98

Figura 5.26 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre o teor de lipídeos da biomassa microalgal durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 101

Figura 5.27 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 103

Figura 5.28 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a concentração de biomassa máxima durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 106

Figura 5.29 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a produtividade volumétrica máxima de biomassa durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 108

Figura 5.30 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre o teor de lipídeos da biomassa durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. 111

Figura 5.31 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a produtividade lipídica durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto..... 114

Figura 5.32 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação da concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado, entre as fases 1 e 2. 116

Figura 5.33 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação da produtividade volumétrica de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2. 118

Figura 5.34 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variação do teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2. 121

Figura 5.35 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variação da produtividade lipídica de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2. 124

Figura 5.36 - Perfis do crescimento celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲), em função do tempo, durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento confirmatório. 126

Figura 5.37 - Concentração de biomassa (X) durante o cultivo de *Chlorella minutissima* em função do tempo (■) e teor de lipídeos (L) da biomassa ao final de cada fase do cultivo (■) no fotobiorreator integrado proposto , referente ao ensaio confirmatório. 127

Figura 5.38 - Biodiesel obtido via catalise ácida a partir do estrato lipídico de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto 134

Figura 5.39 - Imagem do Fotobiorreator integrado proposto (A); Coluna de bolhas (B) e Tubular (C), iluminados internamente com a cor azul, para o cultivo de *Chlorella minutissima*, durante o teste comparativo. 135

Figura 5.40 - Concentração celular de *Chlorella minutissima* em função do tempo, para os fotobiorreatores integrado (A -♦-); coluna de bolhas (B -■-) e tubular (C -●-)..... 136

Figura 5.41 - Concentração celular de *Chlorella minutissima* em função do tempo, para os fotobiorreatores integrado (A -♦-); coluna de bolhas (B -■-) e tubular (C -●-)..... 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Potencial de produção de óleo e biodiesel de diversas fontes oleaginosas em comparação com as microalgas.....25

Tabela 2.2 - Composição celular em massa (%) de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos graxos de algumas microalgas. 32

Tabela 2.3 - Picos de absorção de comprimentos de onda pelas clorofilas 32

Tabela 2.4 - Relação entre energia do fóton e cor da luz emitida. 54

Tabela 4.1 - Fatores de operação do fotobiorreator integrado durante os ensaios de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e a respectiva codificação dos níveis. 70

Tabela 4.2 - Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L9. 70

Tabela 5.1 - Concentração de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, referente a cada condição experimental do planejamento de Taguchi.....76

Tabela 5.2 - Concentração máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 1, empregando o fotobiorreator integrado proposto. 94

Tabela 5.3 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.....95

Tabela 5.4 - Produtividade volumétrica de biomassa máxima de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi ao final da fase 1, empregando o fotobiorreator integrado proposto.....97

Tabela 5.5 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade volumétrica de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto 99

Tabela 5.6 - Teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima* alcançado em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 1, empregando-se o fotobiorreator integrado proposto. 100

Tabela 5.7 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o teor de lipídeos da biomassa microalgal durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto. 101

Tabela 5.8 - Produtividade lipídica máxima de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi na fase 1, empregando o fotobiorreator integrado.....103

Tabela 5.9 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto 104

Tabela 5.10 - Concentração máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 2, empregando-se o fotobiorreator integrado. 105

Tabela 5.11 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto 107

Tabela 5.12 - Produtividade volumétrica máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 2, empregando o fotobiorreator integrado 108

Tabela 5.13 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade volumétrica máxima durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto. 109

Tabela 5.14 - Teor de lipídeos da biomassa de *Chlorella minutissima* alcançado em cada condição experimental do planejamento de Taguchi na fase 2, empregando o fotobiorreator integrado 110

Tabela 5.15 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o teor de lipídeos na biomassa durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto. 111

Tabela 5.16 - Produtividade lipídica do cultivo de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi na fase 2, empregando o fotobiorreator integrado. 113

Tabela 5.17 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto 114

Tabela 5.18 - Variação da concentração máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi entre as fases 1 e 2, empregando-se o fotobiorreator integrado. 115

Tabela 5.19 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2. 117

Tabela 5.20 - Variação da produtividade volumétrica máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi entre as fases 1 e 2, empregando o fotobiorreator integrado. 118

Tabela 5.21 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a variação da produtividade volumétrica de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2. 119

Tabela 5.22 - Variação do teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi entre as fases 1 e 2, empregando o fotobiorreator integrado. 120

Tabela 5.23 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a variação do teor de lipídeos da biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, entre as fases 1 e 2. 122

Tabela 5.24 - Variação da produtividade lipídica de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, entre as fases 1 e 2, empregando o fotobiorreator integrado. 123

Tabela 5.25 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a variação da produtividade lipídica de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, entre as fases 1 e 2. 124

Tabela 5.26 - Propostas de ajustes dos níveis dos fatores estudados no cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado, segundo análises estatísticas realizadas, visando maximizar cada uma das variáveis respostas. 125

Tabela 5.27 - Resultados obtidos com o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado, referente ao ensaio confirmatório nas fases 1 e 2. 128

Tabela 5.28 - Composição dos ácidos graxos (% m/m) presentes nos extratos lipídicos da *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado sob as iluminações azul, branco e vermelho. 132

Tabela 5.29 - Propriedades estimadas para o biodiesel com base nos perfis dos ácidos graxos da biomassa de *Chlorella minutissima* sob diferentes cores de iluminação do cultivo. 133

Tabela 5.30 - Velocidade específica de crescimento de diversas espécies de microalga do gênero *Chlorella.* 138

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **21**
2.1 Justificativa ambiental **21**
2.2 Microalgas **27**
2.2.1 Classificação **27**
2.2.2 Composição das microalgas **30**
2.2.3 Reprodução e metabolismo **33**
2.3 Meios de cultivo para microalgas **33**
2.4 Sistema de cultivo **37**
2.5 Fotobiorreatores **38**
2.6 Iluminação **52**
2.7 Acompanhamento do crescimento celular e colheita da biomassa **56**
2.8 Extração de lipídeos **59**
2.9 Síntese de biodiesel **60**

3 OBJETIVOS **64**

4 MATERIAL E MÉTODOS **65**
4.1 Espécie da microalga empregada nos experimentos Erro! Indicador não definido.
4.2 Fotobiorreator Integrado internamente iluminado **65**
4.3 Sequência experimental **69**
4.3.1 Avaliação das variáveis de cultivo no fotobiorreator integrado **69**
4.3.2 Avaliação da influência da cor da iluminação sobre o perfil de ácidos graxos dos lipídeos da biomassa de *Chlorella minutissima* **71**
4.3.3 Síntese do biodiesel **71**
4.3.4 Teste Comparativo **71**
4.4 Colheita da biomassa **72**
4.5 Extração dos lipídeos **72**
4.6 Metodologia analítica **72**
4.6.1 Acompanhamento do crescimento celular **72**
4.6.2 Determinação do teor de lipídeos e produtividade lipídica **73**
4.6.3 Análise do perfil de ácidos graxos **74**
4.6.4 Quantificação dos ésteres de etila **74**
4.6.5 Propriedades estimadas do biodiesel baseadas no perfil dos ácidos graxos obtido **74**
4.6.6 Metodologia de análise dos resultados **75**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **76**
5.1 Crescimento celular **76**
5.1.1 Avaliação do crescimento durante a Fase 1 ..... **77**
5.1.2 Avaliação do crescimento celular durante a Fase 2 ..... **85**
5.2 Análise estatística **93**
5.2.1 Resultados obtidos durante a Fase 1 ..... **93**
5.2.1.1 Concentração de biomassa **93**
5.2.1.2 Produtividade volumétrica de biomassa **97**
5.2.1.3 Teor de lipídeos **99**

5.2.1.4 Produtividade lipídica 102
5.2.2 Resultados obtidos durante a Fase 2 105
5.2.2.1 Concentração de biomassa.....105
5.2.2.2 Produtividade volumétrica de biomassa.....107
5.2.2.3 Teor de Lipídeos 110
5.2.2.4 Produtividade Lipídica.....113
5.2.3 Avaliação das variáveis respostas entre as fases 115
5.2.3.1 Concentração de biomassa.....115
5.2.3.2 Produtividade volumétrica de biomassa.....117
5.2.3.3 Teor de lipídeos.....120
5.2.3.4 Produtividade lipídica 123
5.2.4 Experimento confirmatório.....125
***5.3* Perfil dos ácidos graxos extraídos e propriedades estimadas do biodiesel ..131**
5.4 Síntese do biodiesel.....134
5.5 Teste comparativo 135

6 CONCLUSÕES.....140

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....141

REFERÊNCIAS.....142

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da temperatura global, ocasionado pela emissão dos gases causadores do efeito estufa, a destacar o dióxido de carbono (CO_2), em grande parte provenientes de atividades antropogênicas, como a queima de combustíveis fósseis, vem impulsionando ao longo dos anos pesquisas em busca de combustíveis alternativos e renováveis, como os biocombustíveis. Estes apresentam um balaço equilibrado entre o CO_2 emitido durante a queima e a posterior absorção durante a formação da biomassa, configurando um ciclo sustentável.

Os biocombustíveis como o bioetanol e o biodiesel são substitutos alternativos à gasolina e ao diesel respectivamente, e dispõem de diversas fontes renováveis convencionais de matérias primas, como a cana-de-açúcar e o milho, para a produção de bioetanol, e a para a produção de biodiesel.

No Brasil, o diesel é o combustível que mais contribui para a emissão de CO_2 na atmosfera, devido à forte dependência do transporte rodoviário, fato que chama a atenção para a evidente necessidade de diminuir a dependência desse combustível fóssil e substitui-lo pelo biodiesel.

As matérias-primas para a produção de biodiesel se baseiam em óleos e gorduras, podendo ser de origem vegetal, como óleos de soja, amendoim, algodão e girassol, de origem animal, como óleo de peixes, sebo bovino, banha de porco e gordura de frango, ou óleos e gorduras residuais de frituras, todas fontes também comprometidas com finalidades alimentícias.

No mais, uma outra matéria-prima, não competitiva com a cadeia de alimentos, têm recebido especial atenção por apresentar muitas vantagens quando comparada às fontes convencionais. Tratam-se das microalgas, micro-organismos fotossintéticos capazes de acumular altos teores de óleo em seu citoplasma que, por sua vez, pode ser extraído da biomassa e convertido em biodiesel.

As microalgas crescem numa velocidade elevada (menos de uma semana), necessitando pequenas áreas territoriais para se desenvolverem, apresentando alta eficiência fotossintética e, por consequência, boa absorção de CO_2 atmosférico. Utilizam ou não efluentes domésticos e industriais para se desenvolver (não necessitando de água limpa), destacando-se assim como uma promissora matéria-prima para a produção de biodiesel.

Nesse sentido, os cultivos de microalga visando grandes formações de biomassa são conduzidos normalmente em biorreatores iluminados, chamados de fotobiorreatores, que

podem apresentar diversos formatos e configurações, sendo os fotobiorreatores colunas de bolhas, tubulares, placas planas e tanques a céu aberto no formato de “raceways”, as configurações mundialmente mais conhecidas e amplamente difundidas. Porém, o projeto e o desenvolvimento de fotobiorreatores com novas configurações e diferentes modos de iluminação desempenham ainda um papel crucial na otimização do crescimento celular e aumento na formação de biomassa.

Combinado aos estudos de desenvolvimento de novos fotobiorreatores, muitos pesquisadores têm relatado a eficácia em submeter os cultivos das mais variadas espécies de microalgas a duas fases de cultivo, na qual a primeira fase visa apenas a formação da biomassa, e a segunda, caracterizada por um período de estresse, como alteração de temperatura, regime de iluminação e principalmente a privação de nutrientes (com destaque à privação da fonte de nitrato), proporciona significativo aumento no acúmulo de lipídeos nas células das microalgas.

Desse modo, no presente trabalho tem-se como objetivo propor um fotobiorreator internamente iluminado por luz de LED, que integre as configurações coluna de bolhas e tubular, ocupando a mesma área territorial para o cultivo de *Chlorella minutissima*, em duas fases, sendo a segunda fase sob privação parcial da fonte de nitrato, visando à produção de biomassa e o teor lipídico, para posterior utilização como matéria prima para a produção de biodiesel. Para tal, utilizou-se a técnica de Planejamento de Experimentos, em particular o Método de Taguchi, para avaliar a influência da cor e do fotoperíodo, referentes à iluminação do fotobiorreator, da aeração fornecida ao meio de cultivo e da vazão de recirculação do próprio meio de cultivo pelo fotobiorreator. Os resultados obtidos neste estudo introduziram estratégias tecnológicas que contribuíram com informações importantes para o desenvolvimento de novas pesquisas visando a produção de biomassa microalgal para conversão em biocombustíveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Justificativa ambiental

A temperatura média do planeta vem aumentando ano a ano e ocasionando sérios desequilíbrios climáticos, como por exemplo, alteração no regime de chuvas e derretimento das geleiras, que implicam prejuízos nas agriculturas locais e elevação no nível de oceanos. Muito dessa elevação da temperatura global deve-se a emissão antropogênica do dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera, principalmente oriundo da queima de combustíveis fósseis (YEONG et al., 2018).

Diante desse cenário cada vez mais preocupante, 195 países se comprometeram, em um acordo firmado em Paris, a manter o aumento da temperatura global abaixo de 1,5 ˚C, sendo que para cumprirem essa meta, eles devem investir em tecnologias para equilibrar o balanço de emissões de carbono (emissões positivas) com a captura de carbono (emissão negativa), uma vez que o acúmulo de CO_2, um dos principais gases causadores do efeito estufa, na atmosfera, contribui significativamente para o agravamento do aquecimento global (HECK et al., 2018).

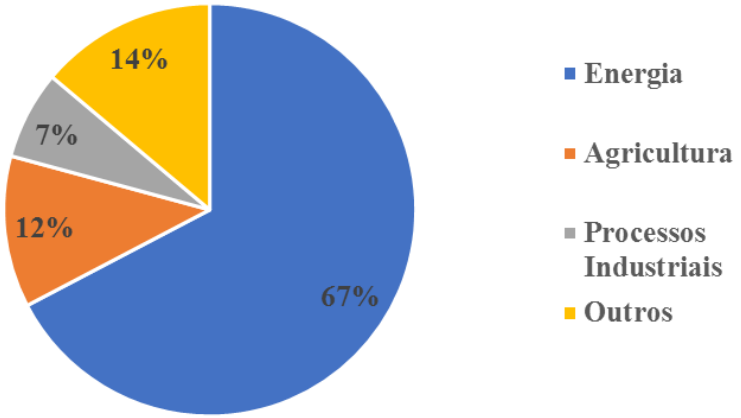
A atenção à concentração de CO_2 na atmosfera se justifica pela crescente elevação de seus índices desde o século passado, numa proporção média de 2 partes por milhão (ppm) ao ano, alcançando em 2016 aproximadamente 403 ppm, valor este que representa 40% a mais de CO_2 na atmosfera em relação à metade do século XIX (IEA, 2017).

Ainda de acordo com o IEA (2017), a contribuição antropogênica na emissão de CO_2 na atmosfera está majoritariamente relacionada a fins energéticos, que inclui os meios de transportes, correspondendo a 67%, principalmente como resultado da oxidação do carbono durante a combustão dos mais variados combustíveis.

Nesse sentido, no que diz respeito apenas a finalidades energéticas, somente a contribuição dos combustíveis fósseis, que respondem por mais de 80% da emissão antropogênica de CO_2 na atmosfera terrestre, correspondeu a aproximadamente 35 giga toneladas de CO_2 no ano de 2015 (IEA, 2017).

A Figura 2.1 apresenta a distribuição da contribuição por setor (agricultura, energia e indústria, como exemplos) na emissão antropogênica de CO_2 na atmosfera.

Figura 2.1 - Distribuição da contribuição por setor na emissão antropogênica de CO_2 na atmosfera.



Fonte: IEA (2017)

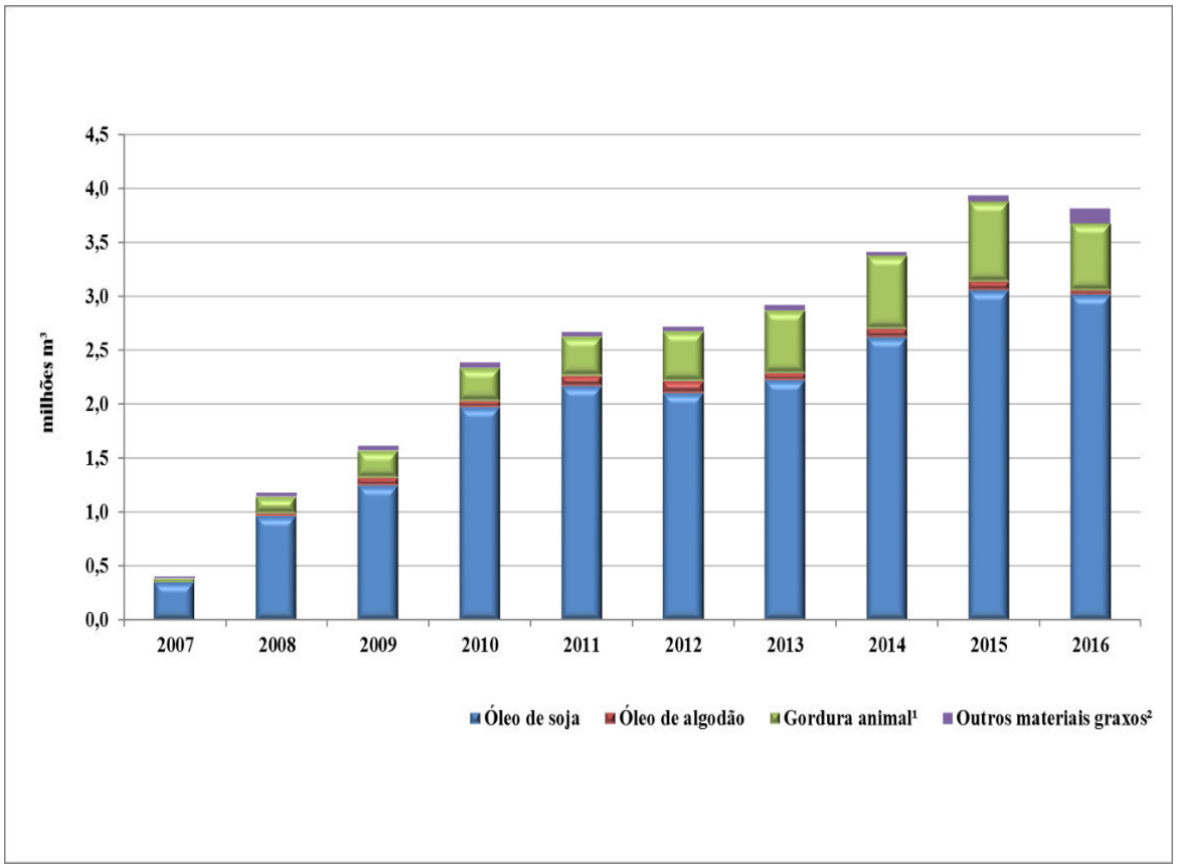
Embora tecnicamente exista uma matriz energética diversificada, entre hidrelétricas, termoelétricas, eólicas, solar e nuclear, o planeta concentra-se na dependência majoritária das termoelétricas, que queimam carvão (na sua maioria) e gás natural, combustíveis fósseis que são de origem finita e não sustentável, basicamente transferindo o carbono terrestre para a atmosfera, principalmente na forma de CO_2 (HECK et al., 2018).

Além da presença maciça dos combustíveis fósseis para a geração de energia elétrica, estes também dominam o setor de transportes, sobrecarregado de veículos movidos à combustão, tendo como expoentes ônibus e caminhões abastecidos pelo diesel, combustível de origem fóssil que mais contribui para as emissões de CO_2. O diesel é responsável, apenas no Brasil, pela emissão de aproximadamente 150 milhões de toneladas desse gás na atmosfera, seguido pela gasolina (origem fóssil), com algo em torno de 50 milhões de CO_2, emissão comparável ao etanol, segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2017). Porém, o etanol se enquadra na categoria de biocombustível, pois é proveniente de matéria-prima renovável, ou seja, não finita, proveniente de vegetais como a cana-de-açúcar e o milho por exemplo, que durante o seu desenvolvimento capturam o CO_2 presente na atmosfera, balanceando as emissões resultantes de sua queima como combustível (ZHU, 2015; BRENNAN ; OWENDE, 2010).

Nessa mesma linha, o biodiesel é o biocombustível que pode substituir o diesel, podendo ser produzido a partir de óleos vegetais (soja, palma, girassol, algodão, amendoim e outros), óleos de micro-organismos (cianobactérias e microalgas), gordura animal e pelo reuso de óleo proveniente de fritura (DA RÓS et al, 2014; AHMAD et al., 2011).

Aproximadamente 79% do biodiesel produzido no Brasil provem da soja, que responde por mais de 3 milhões de metros cúbicos, seguida pela gordura animal (16,3%), conforme pode ser observado no gráfico da Figura 2.2, em sua maior parte cultivada nas regiões centro-oeste e sul do país (ANP, 2017).

Figura 2.2 - Percentual representativo das matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil.

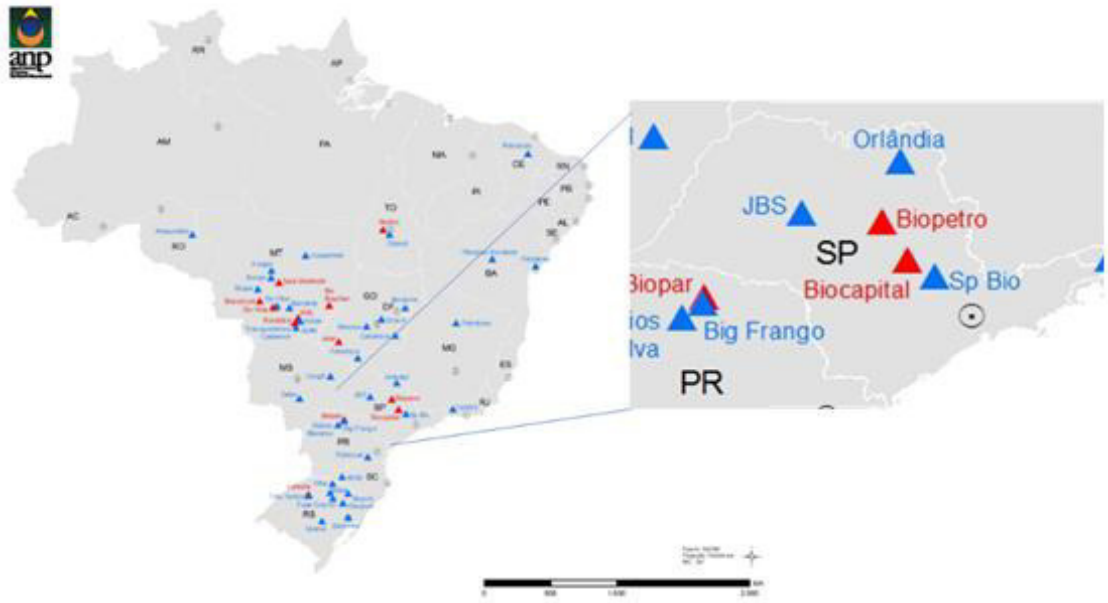


Fonte: ANP (2017).

A produção nacional de biodiesel atingiu 3,8 milhões de metros cúbicos no ano de 2016, impulsionada pelas regiões centro-oeste e sul, com 1,6 e 1,5 milhões de metros cúbicos de biodiesel, respectivamente. A região sudeste respondeu por apenas 254.259 m^3 de biodiesel produzido, mesmo o estado de São Paulo contando com empresas como a Biopetro, a Biocapital, a JBS, a Orlândia e a SP bio (ANP, 2017).

A Figura 2.3 apresenta a distribuição das empresas produtoras de biodiesel no Brasil, destacando-se as empresas instaladas no estado de São Paulo.

Figura 2.3 - Distribuição das empresas produtoras de biodiesel no Brasil.



Fonte: ANP (2017).

Entretanto, uma das questões delicadas que envolvem a utilização da soja como matéria prima para produção de biodiesel é a competição com o seu uso alimentício, uma vez que muitos países enfrentam sérios problemas de fome e escassez (CARVALHO JÚNIOR, 2010).

Em contrapartida, o uso da biomassa de microalgas para a produção de biodiesel vem ganhando destaque, pois este tipo de micro-organismo apresenta altas taxas de crescimento mesmo ocupando pequenas áreas territoriais de cultivo, e podendo gerar elevadas quantidades de biomassa e óleos extraídos de sua biomassa seca, comparado com os oleaginosos vegetais. O cultivo de microalgas promove a biofixação do CO_2, permite que se utilizem águas residuais de tratamento de efluentes industriais e domésticos e não compete com a produção agrícola de alimentos (TAN et al., 2018; SHUBA, KIFLE, 2018).

Enquanto a soja, principal matéria-prima no Brasil, cultivada por exemplo numa área de 1 hectare, é capaz de produzir 562 kg de biodiesel por ano, o cultivo de uma espécie de microalga com elevado teor de óleo em 1 hectare é capaz de fornecer 121.104 kg de biodiesel, conforme pode ser observado na Tabela 2.1, que apresenta o potencial de produção de óleos por microalgas, bem como a capacidade produtiva de biodiesel em relação a área territorial ocupada no cultivo comparado às culturas oleaginosas convencionais como milho, soja, camelina, girassol e palma (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Tabela 2.1 - Potencial de produção de óleo e biodiesel de diversas fontes oleaginosas em comparação com as microalgas.

Matéria-prima	Teor de óleo (%m.m^{-1})	Produtividade em óleo (L.ha^{-1}.a^{-1})	Área necessária (m^2.ano^{-1}.kg^{-1} biodiesel)	Produtividade em biodiesel (kg.ha^{-1}.a^{-1})
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Camelina	42	915	12	809
Girassol	40	1070	11	946
Palma	36	5366	2	4747
Microalga (Teor reduzido de óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalga (Teor médio de óleo)	50	97800	0,1	86515
Microalga (Teor elevado de óleo)	70	136900	0,1	121104

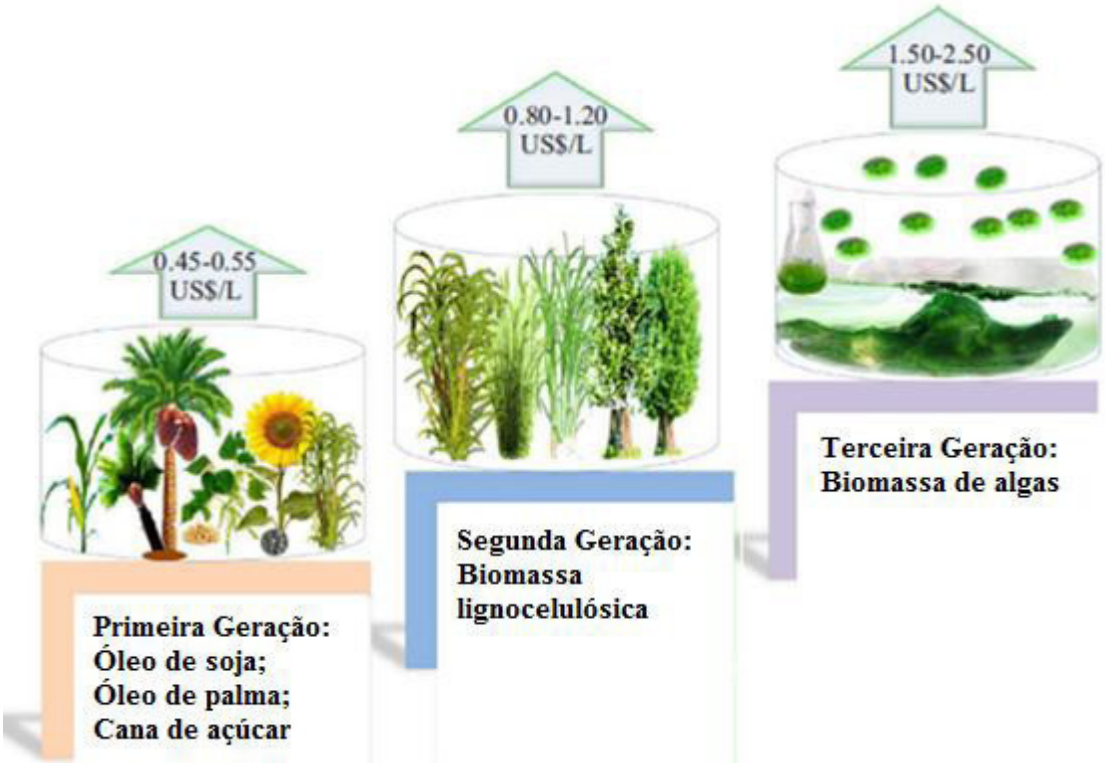
Fonte: Mata, Martins e Caetano (2010).

Segundo Rastogi et al. (2018), mesmo que seja alto o potencial para a produção de biodiesel, que é considerado como um biocombustível de terceira geração, este apresenta um custo de produção consideravelmente elevado quando comparado aos biocombustíveis de primeira e segunda geração, variando em média entre 1,5 a 2,5 US$/L.

Neste cenário, os biocombustíveis de primeira geração, que são classificados como aqueles oriundos diretamente dos vegetais, como o bioetanol da cana-de-açúcar, ou proveniente de óleos vegetais como a soja, que fornece o biodiesel de soja, custam de 0,45 a 0,55 US$/L, enquanto os biocombustíveis de segunda geração, que são classificados como aqueles oriundos de resíduos lignocelulósicos como o bagaço da cana-de-açúcar, por exemplo, podem custar de 0,8 a 1,2 US$/L (RASTOGI et al., 2018).

A Figura 2.4 ilustra uma comparação relativa dos valores (em média) do custo de produção dos biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração.

Figura 2.4 - Comparação dos custos de produção para biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração.

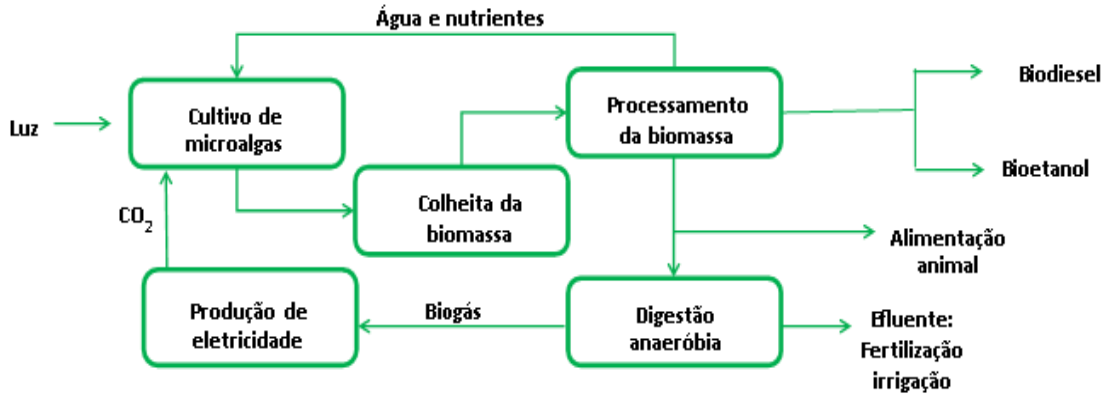


Fonte: Rastogi et al. (2018).

Desse modo, para que a produção de biodiesel de microalgas seja viável economicamente, pode-se aproveitar o seu potencial mitigatório das emissões de gás carbônico, canalizando tais emissões das unidades geradoras, como indústrias e termoelétricas, por exemplo, conduzindo-as até uma estação de produção de biomassa de microalgas, ajudando na redução dos excedentes desse gás na atmosfera e favorecendo a formação de biomassa para a produção de biocombustíveis. Após a utilização da biomassa na produção do biocombustível, a parte excedente pode também ser destinada a outras aplicações, como, alimentação animal, fertilização de solos e geração de biogás para a produção de energia elétrica, sendo que, o CO_2 emitido durante a geração elétrica, retorne ao cultivo (CHISTI, 2008).

A Figura 2.5 apresenta um processo conceitual de biorrefinaria que pode ser aplicado para viabilizar economicamente a produção de biomassa de microalgas para várias aplicações e finalidades.

Figura 2.5 - Processo conceitual para a produção de biocombustível a partir de biomassa microalgal.



Fonte: Adaptado de CHISTI (2008).

Além do biodiesel e do bioetanol, as microalgas podem fornecer, a partir de sua biomassa, biohidrogênio e biometano como gases combustíveis, vitaminas e proteínas para nutrição humana e animal, e produtos de alto valor agregado, como luteína e ômega-3 como produtos fármacos, e pigmentos (clorofila e carotenos), configurando o conceito de biorrefinaria (RASTOGI et al., 2018; AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

2.2 Microalgas

2.2.1 Classificação

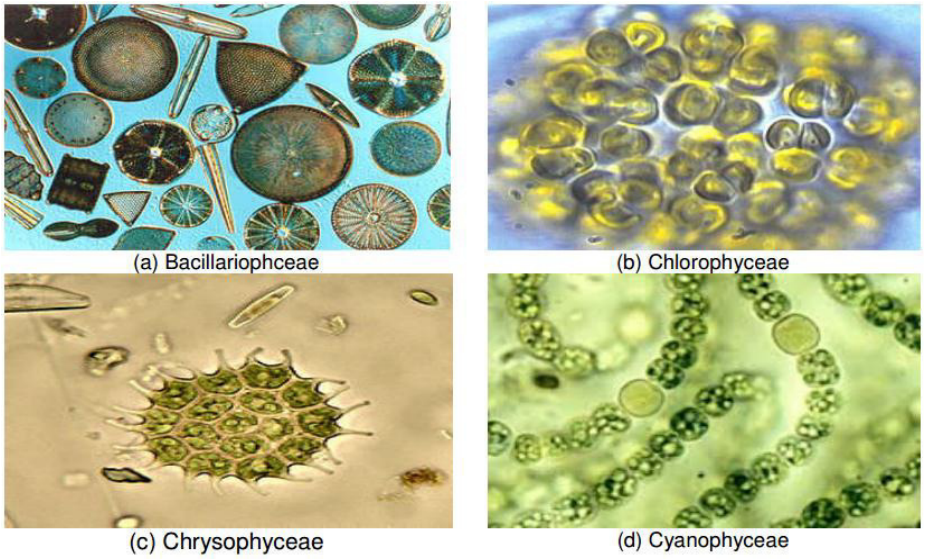
As microalgas são organismos unicelulares ou pluricelulares com dimensões microscópicas, capazes de realizar fotossíntese, devido à presença de clorofila. Estima-se que existam de 200.000 a 800.000 espécies de microalgas, podendo ser divididas em procarióticas e eucarióticas. Estas, por sua vez, com 12 divisões (Quadro 2.1), sendo que os quatro grupos mais importantes em termos de abundância são as algas verdes (*Chlorophyceae*), as verde-azul (*Cyanophiceae*), as marrons (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), ilustradas na Figura 2.6. Dentre os diversos gêneros de microalgas, destacam-se as *Chlorellas*, que pertencem a classe das *Trebouxiophyceae* do grupo das *Chlorophyceae* (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; REIBER, 2007; CHISTI, 2004).

Quadro 2.1 - Classificação dos grupos de microalgas.

Reino	**Divisão**
Procariotos	Cyanophyta Prochlorophtya
Eucariotos	Glucophyta Rhodophyta Heterokontophtya Haptophyta Cryptophyta Dinophyta Euglenophyta Chlorarachniophyta Chlorophyta Bacillariophyta Xanthophyta Phaeophyta

Fonte: REIBER (2007).

Figura 2.6 - Grupos mais abundantes de microalgas



Fonte: AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS (2015).

As microalgas habitam principalmente meios aquáticos, como lagos, rios e oceanos, embora possam viver em ambientes sólidos úmidos, como solos e rochas úmidas. Elas apresentam cerca de 50% de carbono em sua composição, com base em sua biomassa

seca, em boa parte obtido do dióxido de carbono advindo da fotossíntese (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; CHISTI, 2007).

No mar, as microalgas constituem o fitoplâncton, que são responsáveis por aproximadamente 90% da atividade fotossintética nos oceanos, podendo levar anualmente a uma fixação de 45 a 50 Gton de carbono pelos oceanos (SPOLAORE et al., 2006). Estima-se que são absorvidos 1,8 kg de CO_2 durante a fotossíntese para a formação de 1kg de biomassa microalgal (YADAV, SEM, 2017; SÁNCHEZ MIRÓN et al., 2002). A reação da fotossíntese que representa essa conversão de CO_2 em biomassa pode ser representada de forma simplificada pela equação 2.1.

$$\mathbf{6\,CO_2 + 6\,H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2} \qquad \textbf{(2.1)}$$

Os primeiros relatos da utilização das microalgas pelo homem datam de mais de 2000 anos na China, como alimento para combater a fome, prática também relatada pelos índios Astecas, que colhiam as algas de lagos e secavam nas pedras antes de ingeri-las (SPOLAORE et al., 2006).

Entretanto o cultivo antropogênico, em escala laboratorial, iniciou-se no período de 1870-1880, com o desenvolvimento de métodos de cultivos de microalgas muito relacionados a estudos bacteriológicos, onde a semelhança pode ser observada na utilização de termos e procedimentos da bacteriologia, como as repicagens e o uso de balões e frascos Erlenmeyer. Um dos pesquisadores pioneiros no cultivo de microalgas é o microbiologista holandês Martinus Willem Beijerink (1851-1931), que realizou o isolamento de clorofíceas de água doce dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* (LOURENÇO ,2006).

Considera-se que a Alemanha tenha sido o país pioneiro no cultivo de microalgas em larga escala durante a Segunda Guerra Mundial, visando a utilização da biomassa principalmente para alimentar as tropas e a sua população. Neste projeto foi utilizada a microalga verde do gênero *Chlorella* (BECKER, 1994).

Atualmente, inúmeras espécies são produzidas mundialmente em escala comercial, principalmente para a produção de produtos farmacêuticos, suplementos alimentares e rações animais, como a *Spirulina platensis, Chlorella* sp., *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*. O interesse na utilização da biomassa microalgal para fins nutracêuticos deve-se ao fato desta ser rica em proteínas em sua composição, sendo que algumas espécies como a *Chlorella* sp. podem conter em torno de 50% de proteína em sua composição (SATHASIVAM et al., 2017).

Além de proteínas, as microalgas são compostas basicamente de carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, sendo que as proporções variam amplamente entre as espécies e de acordo com as condições de cultivo, (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

2.2.2 Composição das microalgas

A composição biológica não é uma constante intrínseca das microalgas, uma vez que esta varia amplamente entre as espécies e sofre forte influência de fatores ambientais como temperatura, iluminação, fotoperíodo, pH do meio de cultivo, nutrientes minerais, suplemento de CO_2, etc. (BECKER, 1994). Sabe-se que a concentração de nitrato no meio de cultivo de microalgas influencia significativamente a produção de lipídeos pela célula, principalmente quando disponível em baixas concentrações, induzindo ao seu acúmulo no interior da célula, (ÖRDÖG et al., 2016).

As microalgas sintetizam os lipídeos a partir da fonte de carbono, seja inorgânico, como o CO_2, ou orgânico (glicose, acetato, etc.). Os componentes e os teores de lipídeos nas células das microalgas variam de espécie para espécie, sendo divididos basicamente em lipídeos neutros (triglicerídeos e colesterol) e lipídeos polares, como os fosfolipídeos. Os lipídeos neutros, como os triglicerídeos, são considerados como o principal material para a produção do biodiesel (HUANG et al., 2010).

O teor de óleo comumente encontrado nas microalgas situa-se na faixa de 20 a 50%, porém estes teores podem ser elevados de acordo com a manipulação dos cultivos visando ao acúmulo de lipídeos. No mais, microalgas do gênero *Chlorella* requerem menor tempo de cultivo e apresentam alta produtividade celular, sendo amplamente estimulada para a destinação como matéria-prima para a produção de biodiesel, uma vez que os lipídeos extraídos da sua biomassa microalgal podem ser utilizados para produção de biodiesel. A conversão em biodiesel ocorre pela reação de transesterificação usando álcool em presença de ácido ou base (CHISTHI, 2007; BRENNAN; OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010).

Um outro grupo de substâncias abundante na composição da maioria das espécies de microalgas são as proteínas, podendo variar de 6 a 71% de sua composição celular, e fortemente relacionadas à formação dos fotorreceptores celulares, que são responsáveis pela detecção luminosa (REIBER, 2007).

A alta quantidade de proteínas presente na composição celular nas mais variadas espécies de microalgas confere a esses micro-organismos o seu reconhecimento como fonte

não convencional de proteínas. As proteínas extraídas da biomassa microalgal para nutrição humana são comercializadas atualmente em diversas formas como, tabletes, cápsulas e líquidos, podendo ser incorporadas em massas, bolos, doces e bebidas (SATHASIVAM et al., 2017; BECKER, 1994).

Juntos com as proteínas, destaca-se a considerável composição de inúmeras vitaminas essenciais presentes nas microalgas: vitamina A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico, dentre outras, em teores que variam entre as espécies e de acordo com as técnicas de cultivo, bem como os ácidos nucleicos, que compreendem de 1 a 6 % da composição celular das microalgas, e desempenham papel vital no crescimento e reparação celular. Devido à presença de fósforo e nitrogênio em grandes quantidades nos ácidos nucleicos, a biomassa microalgal pode ser utilizada também como fertilizante (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Já os carboidratos compreendem o produto final da fotossíntese nas microalgas, e podem variar de 4 a 64% da sua composição celular (Tabela 2.3). Estes são sintetizados pela fixação do CO_2 na forma de glicose, dissacarídeos e amido como fonte primária de energia para a célula (LOURENÇO, 2006).

A partir da biomassa microalgal, os carboidratos podem ser extraídos e convertidos em etanol, pelo processo de fermentação anaeróbia usando leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo), ou sofrerem degradação da matéria orgânica em condições anaeróbias levando à formação de metano e dióxido de carbono (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Todas as microalgas possuem um ou mais tipos de clorofila dentre os quatro tipos existentes, clorofila *a*, *b*, *c* e *d*, sendo a clorofila *a* o pigmento mais importante para a fotossíntese, representando papel principal no arranjo dos fotossistemas para a captação da energia luminosa. As demais clorofilas desempenham papéis secundários, contribuindo para aumentar o total de luz absorvido pela microalga. Comercialmente, as clorofilas são utilizadas principalmente na indústria de corantes naturais (LOURENÇO, 2006).

A Tabela 2.2 apresenta a composição celular média em relação a massa seca de proteínas, carboidratos e lipídeos de algumas espécies de microalgas e a Tabela 2.3 apresenta os picos de comprimento de onda absorvidos para cada tipo de clorofila.

Tabela 2.2 - Composição celular em massa (%) de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos graxos de algumas microalgas.

Espécies	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Ácidos nucleicos
Scenedesmus obliquus	50–56	10–17	12–14	3-6
Scenedesmus quadricauda	47	-	1.9	-
Scenedesmus dimorphus	8–18	21–52	16-40	-
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21	-
Chlorella vulgaris	51-58	12–17	14–22	4-5
Chlorella pyrenoidosa	57	26	2	-
Chlorella minutissima	-	-	31	-
Spirogyra sp.	6–20	33–64	11–21	-
Dunaliella bioculata	49	4	8	-
Dunaliella salina	57	32	6	-
Euglena gracilis	39-61	14-18	14-20	-
Prymnesium parvum	28-45	25-33	22-38	1-2
Tetraselmis maculata	52	15	3	-
Porphyridium cruentum	28-39	40-57	9-14	-
Spirulina platensis	46–63	8–14	4-9	2-5
Spirulina máxima	60–71	13–16	6-7	3-4,5
Synechoccus sp.	63	15	11	5
Anabaena cylindrica	43–56	25–30	4-7	-

Fonte: (SHUBA, KIFLE, 2018; AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Tabela 2.3 - Picos de absorção de comprimentos de onda pelas clorofilas.

	Comprimentos de onda absorvidos (nm)
Clorofila *a*	430 e 664
Clorofila *b*	435 e 645
Clorofila c_1	440, 583 e 634
Clorofila c_2	452, 586 e 635
Clorofila *d*	400, 456 e 700

Fonte: LOURENÇO (2006).

Os carotenoides compreendem o segundo grupo de pigmentos fotossintetizantes, podendo atingir 25% da biomassa seca microalgal dependendo da espécie e condição de cultivo. Os carotenoides são divididos em carotenos, moléculas que contém apenas carbono e hidrogênio, como o β-caroteno, e as xantofilas, que além de carbono e hidrogênio,

apresentam oxigênio em sua estrutura, como a luteína (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

2.2.3 Reprodução e metabolismo

A reprodução das microalgas pode ser assexuada ou sexuada. Na reprodução assexuada ocorre a produção de esporos, que podem ser originados de células vegetativas ou de regiões especiais do talo, denominados esporângios (LOURENÇO, 2006).

Dependendo da espécie, as microalgas apresentam três tipos principais de metabolismo: fotoautorófico, heterotrófico e mixotrófico.

No metabolismo fotoautotrófico as microalgas utilizam a luz como fonte única de energia para transformar o dióxido de carbono do ar em várias formas de energia química como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e hidrocarbonetos, por meio de reações fotossintéticas (BRENNAN; OWENDE, 2010).

No metabolismo heterotrófico as microalgas utilizam apenas compostos orgânicos dissolvidos como fonte de carbono, geralmente sob a forma de glicose e/ou acetato. Em cultivos heterotróficos obtêm-se alta densidade celular, proporcionando menores custos relacionados à etapa de colheita da biomassa (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Já no cultivo mixotrófico as microalgas conseguem realizar a fotossíntese consumindo simultaneamente carbono inorgânico e orgânico, o que permite aumentar a sua produtividade, ou seja, os micro-organismos são capazes de viver tanto em condições autotróficas quanto heterotróficas (BHATNAGAR et al., 2011).

Existem espécies de microalgas, como as espécie *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* que são capazes de se adaptar aos três modos de metabolismo, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

2.3 Meios de cultivo para microalgas

Os meios de cultivo podem ser definidos como o ambiente específico e delimitado, que contenha os nutrientes e elementos necessários ao desenvolvimento do organismo, além da presença de luz, para organismos fotossintéticos como as microalgas (LOURENÇO, 2006).

Para o seu pleno desenvolvimento as microalgas necessitam dispor de macronutrientes essenciais, micronutrientes e vitaminas em baixas concentrações (GUILLARD, 1975).

Macronutrientes

Classificam-se como macronutrientes carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio e ferro, que apresentam funções de grande importância, como constituir a estrutura de biomoléculas, membranas e do meio intracelular, participar do processo de troca de energia e regular atividades metabólicas, dentre outras (LOURENÇO, 2006).

Carbono

O suplemento de carbono no meio de cultivo é de vital importância para a microalga, uma vez que 50% de sua massa seca é composta por esse elemento. A fonte de carbono pode ser disponibilizada como um substrato inorgânico, na forma de CO_2 gasoso ou de um sal (bicarbonato), ou como substrato orgânico, principalmente na forma de açúcar ou acetato (BECKER, 1994).

O CO_2 gasoso corresponde a aproximadamente 0,03% do ar atmosférico e, como apresenta baixa solubilidade na água, é recomendável o suprimento no meio de cultivo através de ar enriquecido com CO_2 para favorecer o crescimento celular (BECKER, 1994).

Embora o suplemento de CO_2 gasoso em cultivos de microalgas favoreça o crescimento celular de um modo geral, verifica-se experimentalmente que cada espécie requer diferentes concentrações desse gás no seu meio (YADAV; SEM, 2017). Para a microalga da espécie *Chlorella* sp. por exemplo, observou-se que o crescimento celular foi favorecido em um cultivo suplementado com 5% de CO_2 (AMARAL et al., 2015) enquanto que *Chlorella minutissima* se desenvolveu bem em cultivos com o fornecimento de 2% de CO_2 gasoso junto com a aeração (LOURES et al., 2018).

As Equações 2.2, 2.3 e 2.4 demostram o equilíbrio de dissolução do CO_2 gasoso e do bicarbonato disponibilizado na água (BECKER, 1994).

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow 2H^+ + CO_3^{2-} \quad \textbf{(2.2)}$$

$$CO_3^{2-} + H^+ \leftrightarrow HCO_3^- \quad \textbf{(2.3)}$$

$$HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow H_2CO_3 \quad \textbf{(2.4)}$$

Em contrapartida ao alto custo envolvido para o suplemento de ar enriquecido com CO_2, os resíduos agroindustriais compõem uma classe promissora de substratos alternativos de baixo custo como fonte de carbono (BECKER, 1994), e até mesmo o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, pode favorecer o crescimento celular, bem como o acúmulo de lipídeos (ANDRULEVICIUTE et al., 2014).

Nitrogênio

O nitrogênio é o segundo elemento mais importante na nutrição microalgal, logo depois do carbono (BECKER, 1994). É um componente fundamental de três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes. Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se a tendência de aumento nas concentrações de proteínas e de clorofila nas células. Em contrapartida, quando as concentrações de nitrogênio disponíveis são baixas, verifica-se a diminuição marcante da taxa de divisão celular (LOURENÇO, 2006).

De um modo geral as microalgas são capazes de utilizar nitrato, amônia ou outra fonte orgânica de nitrato, como a uréia, para o seu desenvolvimento (BECKER, 1994).

Fósforo

Assim como o nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes às microalgas, estando associado a todos os processos que envolvem trocas energéticas nas células, como síntese de ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucléicos e fosfoenzimas (LOURENÇO, 2006).

A principal forma como as microalgas assimilam o fósforo é como fosfato inorgânico ($H_2\mathrm{PO}_4^-$ ou HPO_4^{2-}). A concentração ótima de fósforo no meio de cultivo, bem como a tolerância ao fósforo, varia diferentemente para cada espécie (BECKER, 1994).

Enxofre

O enxofre é constituinte de alguns aminoácidos essenciais (metionina, cisteína e cistina), vitaminas e sulfolipídeos. É comumente disponibilizado no meio de cultivo na forma de sulfatos inorgânicos (BECKER, 1994).

Potássio

O potássio é um elemento requerido por todas as espécies de microalgas, sendo que sua ausência no meio de cultivo prejudica o processo da fotossíntese, além de estar envolvido na síntese de proteínas e na regulação osmótica da célula (BECKER, 1994).

Magnésio

O magnésio é requerido por todas as espécies de microalgas por ocupar posição estratégica no aparato fotossintético, sendo o átomo central da molécula de clorofila (BECKER, 1994).

Ferro

O ferro é um elemento importante ao crescimento celular por se tratar de um dos constituintes dos citocromos, afetando assim o metabolismo celular, a assimilação do nitrogênio e a síntese da clorofila. No meio de cultivo o ferro deve ser fornecido na forma de complexos quelados, como o ácido etilenodiaminotetracético (FeEDTA) (BECKER, 1994).

Micronutrientes

Quanto aos micronutrientes, os principais são manganês, molibdênio, cobalto, boro, vanádio, zinco, cobre e selênio, os quais participam da estrutura e atividade de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006).

Vitaminas

De acordo com Lourenço (2006) as vitaminas que são usualmente adicionadas aos meios de cultivos são:

- Tiamina (B_1), que possui função geral de agir como coenzima;
- Biotina (B_7), que atua no transporte de CO_2;
- Cianocobalamina (B_{12}), que não possui ainda um papel metabólico suficientemente elucidado.

Desse modo, pode-se preparar meios artificiais com todos os nutrientes necessários ao pleno desenvolvimento das microalgas. No que se refere a meios de cultivos para espécies marinhas, pode-se usar a própria água do mar, ou preparar uma solução sintética de água salobra enriquecida com nutrientes (LOURENÇO, 2006).

2.4 Sistema de cultivo

Os cultivos de microalgas podem ser classificados, quanto à forma de condução, como descontínuo, semicontínuo e contínuo.

Segundo Richmond (2004), nos cultivos descontínuos, as células são inoculadas no meio fresco no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes, com exceção do ar e/ou CO_2 inserido. Desse modo, é possível observar seis fases durante o crescimento celular das microalgas:

1) Fase de adaptação ou fase lag, a qual pode ser extensa na presença de tóxicos, nutrientes dificilmente metabolizáveis ou se o inóculo for de reduzida dimensão ou inadequado;

2) Fase de aceleração do crescimento, período onde as células já estão adaptadas e começam a multiplicar-se, e a velocidade específica de crescimento é inferior ao valor máximo;

3) Fase de crescimento exponencial, onde apresenta crescimento acelerado e o valor da velocidade específica de crescimento se mantém constante, atingindo o seu valor máximo;

4) Fase de desaceleração do crescimento, na qual a concentração de um (ou mais) nutriente(s) tornar-se limitante, com o consequente decréscimo da velocidade específica de crescimento;

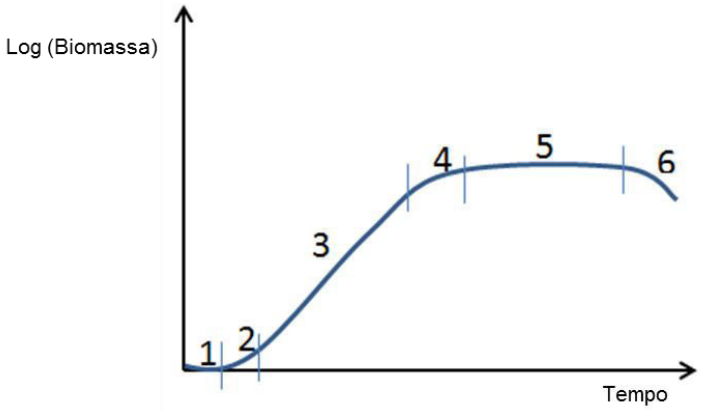
5) Fase estacionária, caracterizada por apresentar uma concentração aproximadamente constante de biomassa à custa da utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são liberados para o meio devido à lise de outras células;

6) Fase de morte, resultante do esgotamento de nutrientes da cultura de micro-organismos, sendo que a cinética de morte é também equivalente a uma reação de primeira ordem (RICHMOND, 2004).

A Figura 2.7 exemplifica uma típica curva de crescimento, destacando as fases acima mencionadas.

Segundo Lourenço (2006), o início dos cultivos em modo semicontínuo, é similar ao sistema descontínuo, na qual inocula-se as microalgas num meio de cultura fresco, e aguarda-se atingir a fase estacionária. Neste momento, uma parcela do meio algal é removida e substituída por meio de cultura novo, sem algas, enquanto que nos cultivos contínuos ocorre um permanente processo de entrada de meio de cultura fresco (sem células) e saída de cultura em iguais taxas e de modo constante.

Figura 2.7 - Variação da biomassa em função do tempo num cultivo de microalgas em modo descontínuo.



Fonte: Autoria própria

2.5 Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores são equipamentos destinados a permitir o aproveitamento da energia luminosa, seja esta natural ou artificial, pelas células do micro-organismo nele presente, com o propósito de fornecer o bioproduto desejado. No caso das microalgas, deseja-se que o fotobiorreator auxilie na promoção do crescimento celular, sendo que para tal tem sido projetado vários tipos de fotobiorreatores, como tanques abertos, colunas de bolhas, placas planas e tubulares (cônicos ou helicoidais), dentre outros (CARVALHO et al., 2014).

De acordo com Huang et al. (2017), os fotobiorreatores podem estar confinados sob a proteção de estruturas cobertas que, quando construídas de materiais transparentes, permitem a iluminação natural, quando não são iluminados artificialmente. Também podem estar dispostos ao ar livre, submetidos às intempéries do clima, interferindo aleatoriamente no desenvolvimento do cultivo nele presente.

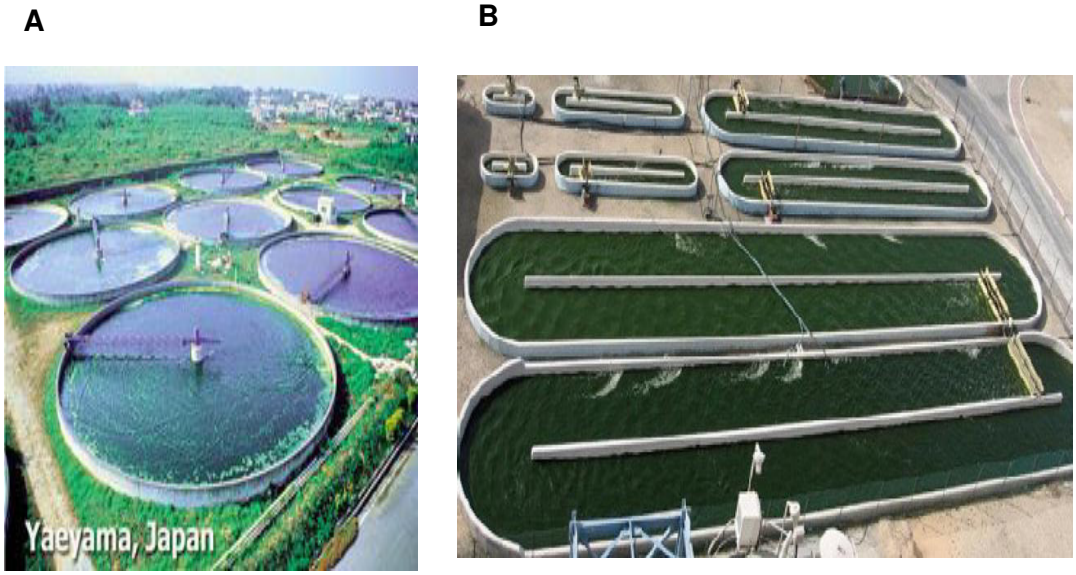
Pensando em minimizar as interferências associadas a fatores externos, como variações no clima, luminosidade prejudicada por dias nublados ou longos períodos chuvosos e possíveis contaminações por insetos, os fotobiorreatores que permitem esse contato direto do meio de cultivo com o ambiente externo (chamados de fotobiorreatores "abertos"), podem ser substituídos por fotobioreatores "fechados", nas quais o meio de cultivo não tem contato com o meio externo, e se provido por iluminação artificial não sofrem com alterações de luminosidade, garantindo maior controle e previsibilidade (SINGH, SHARMA, 2012).

Dentre os fotobiorreatores abertos destacam-se os tanques ou lagoas abertas, conhecidas pelo termo em inglês por *"Open ponds",* que são recipientes de cultivo confeccionados de

materiais plásticos (PVC, por exemplo), fibra de vidro ou cimento, devendo apresentar as superfícies internas lisas, com a finalidade de reduzir eventuais danos devido ao atrito das células e facilitar a limpeza. Na construção dos tanques a profundidade pode variar de 10 a 50 cm aproximadamente, de modo que permita a difusão de dióxido de carbono proveniente da atmosfera e a penetração da luz solar, bem como permitir a aeração mediante o borbulhamento de ar no meio de cultivo (CHISTI, 2007; LOURENÇO, 2006).

A Figura 2.8 apresenta imagens de dois tipos de "Open ponds", comumente utilizados para cultivos em larga escala: "circular pond" e "raceway pond".

Figura 2.8 - Imagem de dois tipos de tanques abertos. Circular pond-(A) e racewaypond-(B).

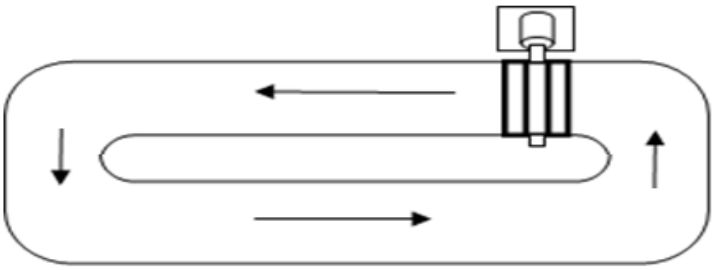


Fonte: AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RIOS (2015).

As "circular ponds", ou tanques circulares, atingem em média 1000 m^2, com 30 cm de profundidade, providas por grandes braços rotacionais que podem se estender até 45 m de diâmetro, alcançando produtividades que podem variar de 1,5 a 16,5 $g.m^{-2}.dia^{-1}$ de biomassa seca, enquanto que o tipo "raceway pond", recebe este nome pelo formato que se assemelha a um circuito de corrida. É o sistema mais utilizado tanto em nível de escala piloto quanto em escala comercial, devido à sua facilidade de operação (SUALI ; SARBATLY, 2012). As produtividades podem variar de 0,19 a 23,5 $g.m^{-2}.dia^{-1}$ de biomassa seca (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

A Figura 2.9 ilustra o esquema de uma *raceway pond*.

Figura 2.9 - Desenho esquemático de uma “raceway pond”.

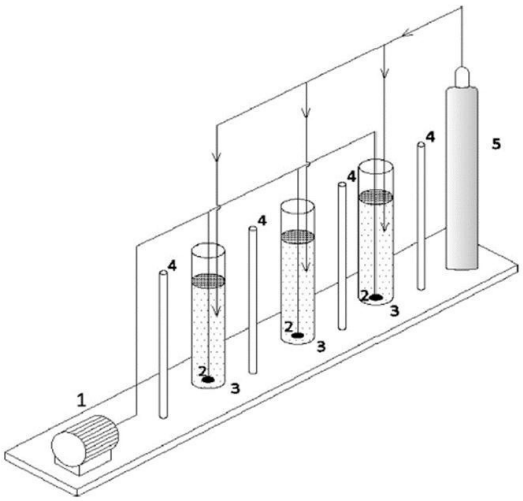


Fonte: Autoria própria

Segundo Huang (2017), na classe dos fotobiorreatores “fechados”, o tipo coluna de bolhas é amplamente utilizado tanto por pesquisadores em escala laboratorial quanto para fins comerciais, devido a sua versatilidade de operação, manuseio e construção, pois tratam-se basicamente de cilindros com elevada razão altura / diâmetro e construídos em materiais transparentes como vidros e principalmente polímeros (acrílicos e policloretos de vinila por exemplo).

A Figura 2.10 mostra um esquema de um sistema composto por três fotobiorreatores de coluna de bolhas (indicados pelo número 2) sobre um suporte de madeira (numeração 3) com iluminação externa (detalhes de numeração 4), providos com injeção de CO_2 (detalhe do cilindro numerado 5) e aeração fornecida por compressor de ar (numeração 1), desenvolvido por Loures et al.(2018) para cultivar a microalga marinha *Chlorella minutissima*.

Figura 2.10 - Desenho esquemático de três fotobiorreatores coluna de bolhas utilizados para o cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.



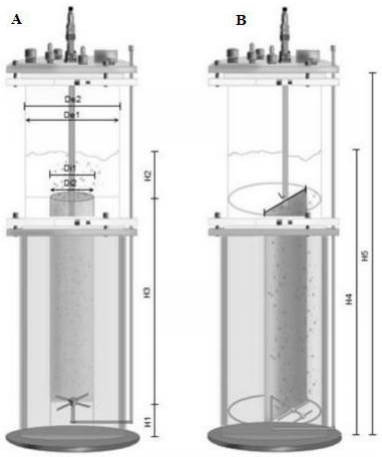
Fonte: Loures et al. (2018).

De acordo com Carvalho (2014), o fotobiorreator coluna de bolhas apresenta uma configuração que dispõe apenas de um sistema de dispersão de ar em sua estrutura interna, que permite controlar o tamanho e a liberação de bolhas de ar promovendo uma agitação pneumática aleatória do meio de cultivo.

Com o intuito de promover uma movimentação orientada do líquido no interior do cilindro, pode-se utilizar fotobiorreatores de modelos “air-lift”, que são equipados com dispositivos denominados “draft tube”, dispositivos que permitem a distinção de duas regiões, uma que apresenta um fluxo ascendente de meio, por onde são liberadas as bolhas de ar (Riser), e outra de fluxo descendente do líquido (Downcomer) (MENDES; BADINO, 2016).

A Figura 2.10 ilustra o esquema de dois modelos *airlift*, um de tubos concêntricos, na qual a aeração é distribuída no centro da base do reator, e o outro de tubo bipartido, onde a aeração é distribuída em uma das metades da base do reator.

Figura 2.11 - Desenho esquemático de modelos “airlift”: cilindro concêntrico (A) e cilindro bipartido (B).



Fonte: (MENDES; BADINO, 2016).

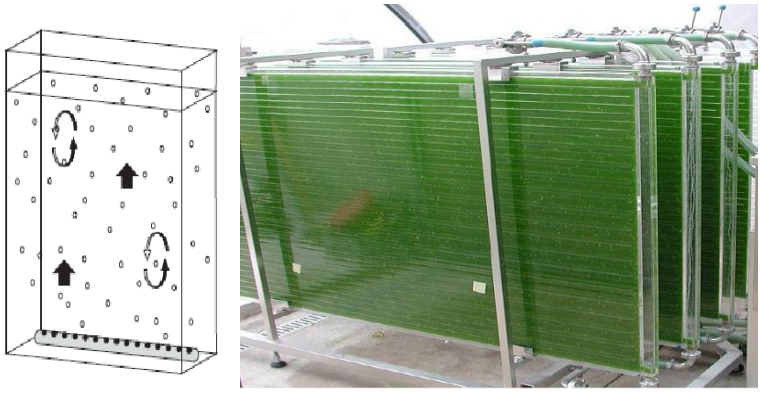
Os fotobiorreatores “flat-plate” são caracterizados por paralelepípedos de vidro, plástico ou outro material que permita a passagem de radiação solar. O ar, enriquecido com dióxido de carbono necessário ao crescimento de biomassa é injetado pela base, e promove a turbulência para que todas as células sejam atingidas pela radiação solar. (HARUN et al., 2010).

A disposição dos fotobiorreatores de placas planas pode variar de modo vertical, horizontal ou inclinado. Apresentam a vantagem de possuir grande área superficial, o que

permite melhor aproveitamento da iluminação recebida, favorecendo a atividade fotossintética das microalgas (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

A Figura 2.12 apresenta o desenho esquemático de fotobiorreatores de placas planas.

Figura 2.12 - Esquema e imagem de fotobiorreator do tipo flat-plate.



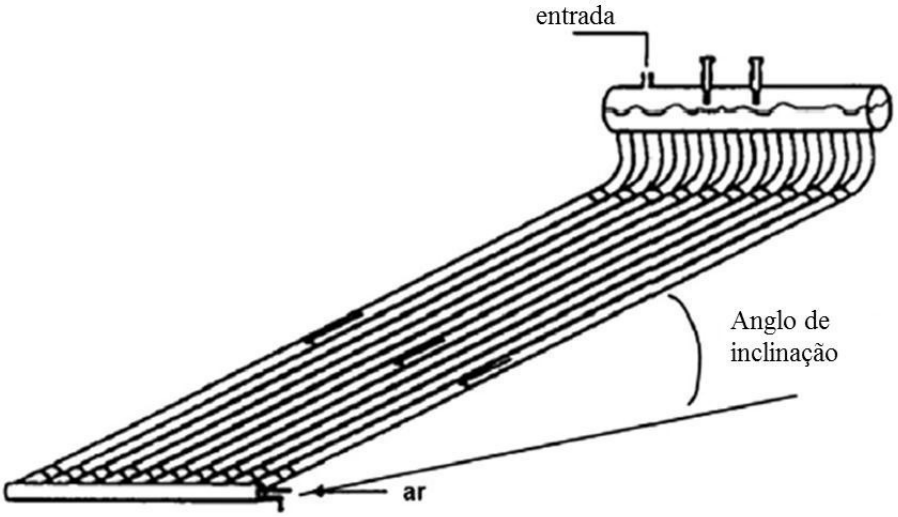
Fonte: (HARUN et al., 2010; HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Os fotobiorreatores do tipo tubular são os mais populares, possuem alta razão de superfície exposta por volume, alta eficiência no uso de CO_2 e bom aproveitamento da luz solar. Eles consistem em conjuntos de tubos transparentes, normalmente de vidro ou plástico, cujo diâmetro é inferior a 0,1 m, uma vez que é necessário luz para que ocorra o processo de fotossíntese. Tais fotobiorreatores podem ser concebidos em vários formatos (Figuras 2.13, 2.14 e 2.15): serpentina, inclinados, espiral, bobinas e em paralelos (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; CARVALHO et al., 2014; SUALI; SARBATLY, 2012; WANG et al., 2012).

Figura 2.13 – Foto de um Fotobiorreator tubular horizontal.

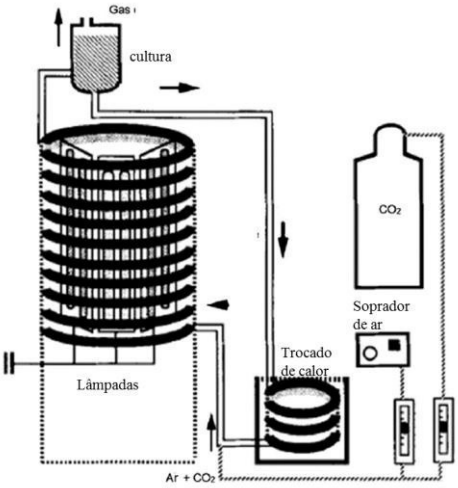
Fonte: (HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Figura 2.14 – Esquema de um Fotobiorreator tubular inclinado.



Fonte: (WANG et al.,2012).

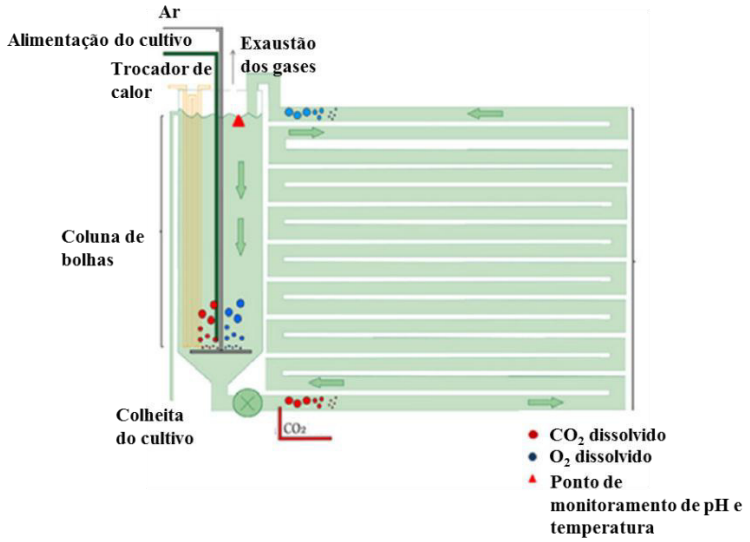
Figura 2.15 - Esquema de um Fotobiorreator tubular helicoidal.



Fonte: (WANG et al., 2012).

No município de Almeria, na Espanha, cultiva-se comercialmente a microalga *Scenedesmus almeriensis*, num fotobiorreator tubular vertical de 3000 L, de propriedade da Fundação CAJAMAR. Os tubos são confeccionados de material polimérico transparente com 90 mm de diâmetro e 400 m de comprimento, conectado a uma coluna de bolhas com 3,5m de altura (SOLIMENO et al., 2017). A Figura 2.16 apresenta uma ilustração do fotobiorreator tubular vertical de 3000 L.

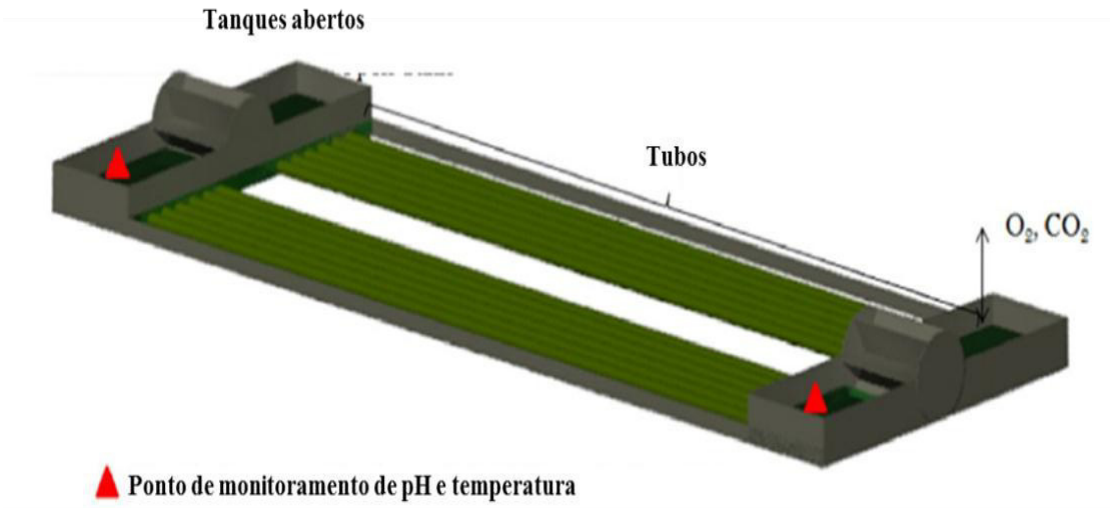
Figura 2.16 – Esquema de um Fotobiorreator tubular vertical conectado a um biorreator de coluna de bolhas.



Fonte: (SOLIMENO et al., 2017).

Em Barcelona, também na Espanha, um fotobiorreator tubular horizontal é composto por dois tanques abertos construídos em polipropileno com dimensões de 1,8 m de comprimento, 1,0 m de largura e 0,4 m de profundidade. Os tanques são ligados a 12 tubos de 50 m de comprimento com 125 mm de diâmetro cada, destinado ao cultivo de microalgas do gênero *Pediastrum* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp (SOLIMENO et al., 2017). A Figura 2.17 apresenta uma ilustração que representa o fotobiorreator tubular horizontal situado em Barcelona.

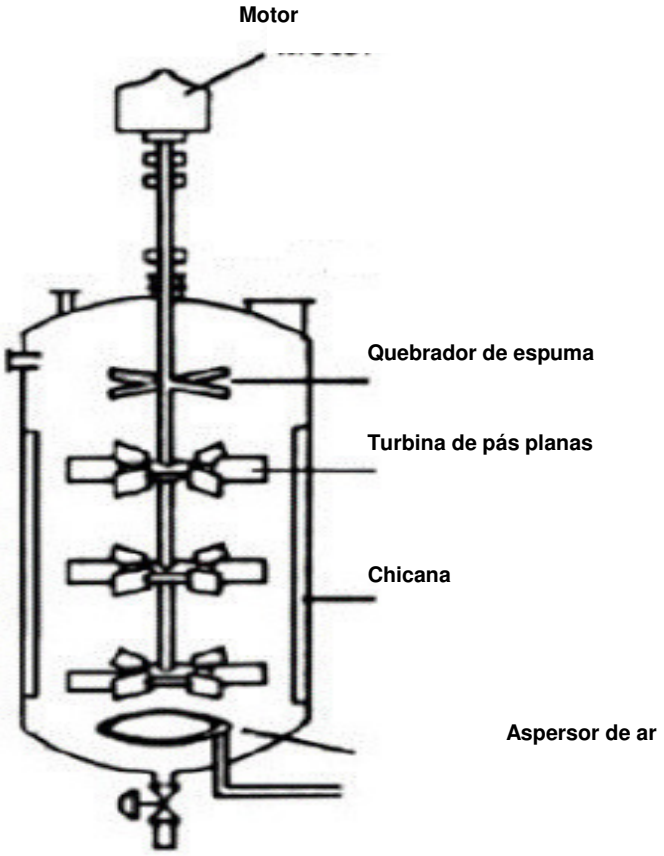
Figura 2.17 – Esquema de um Fotobiorreator tubular horizontal ligado a tanques abertos.



Fonte: (SOLIMENO et al., 2017).

Já os fotobiorreatores do tipo tanque agitado possuem uma estrutura composta por tubos cilíndricos de vidro ou material que permita a passagem de luz natural ou artificial e ocupam pequenas áreas, podendo o reator apresentar sistemas de agitação mecânica ou pneumática (distribuidores de ar), ou até mesmo ambos. São conhecidos como biorreatores de mistura, responsáveis por mais de 90% das aplicações na indústria de fermentação (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; CARVALHO et al., 2014). A Figura 2.18 apresenta um desenho esquemático de um fotobiorreator tanque agitado.

Figura 2.18 - Desenho esquemático de um biorreator tipo tanque agitado.



Fonte: (CARVALHO et al., 2014).

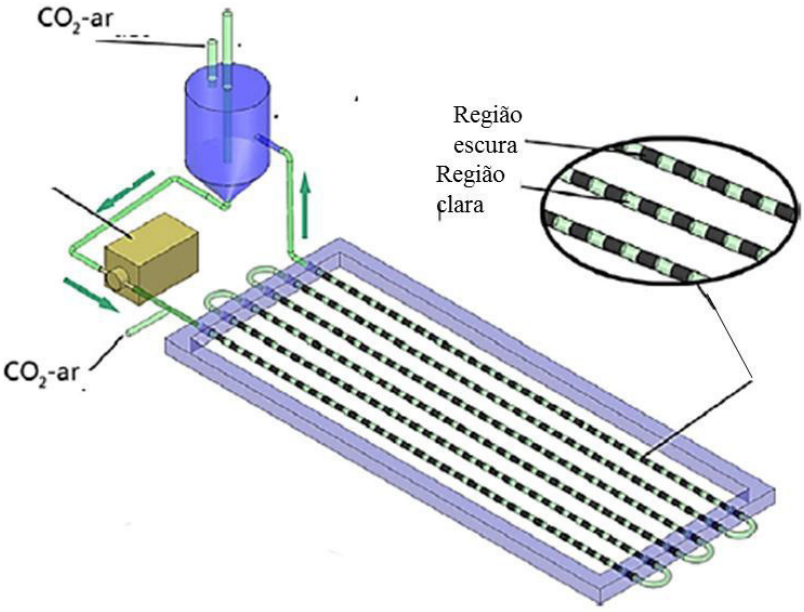
De acordo com Huang et al. (2017), além dos fotobiorreatores já mencionados, encontra-se também como variação de fotobiorreatores verticais, os tipo “bag”, ou sacos, confeccionados em polímeros transparentes e resistentes. Tais fotobiorreatores são dispostos lado a lado e se assemelham a fotobiorreatores tubulares ou cilíndricos, conforme mostrado na Figura 2.19.

Figura 2.19 - Imagem de fotobiorreator tipo “bag”.

Fonte: (HUANG et al., 2017).

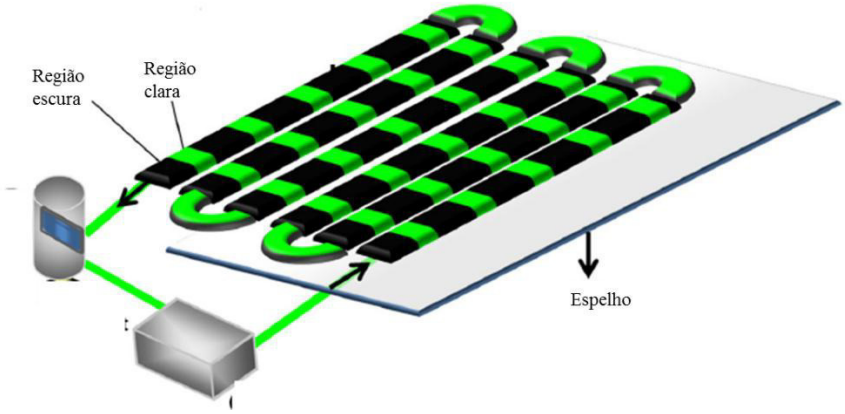
Muitos pesquisadores vêm projetando e desenvolvendo novas configurações ou estratégias de arranjo de fotobiorreatores para estimular o crescimento celular e o acúmulo de metabólitos nas microalgas. Aponta-se como exemplo o fotobiorreator desenvolvido por Liao et al. (2014), que dispuseram horizontalmente um reator tubular tipo serpentina, com regiões do tubo que não permitem a passagem de luz, criando regiões claro: escuro para induzir ao acúmulo de lipídeos durante o crescimento celular. Estratégia semelhante foi idealizada e desenvolvida por Ilus e Abu-Goshi (2016), com um fotobiorreator semelhante, acrescido de um espelho na sua base para aumentar a eficiência de captação luminosa pela reflexão da luz incidente. As Figuras 2.20 e 2.21 ilustram os fotobiorreatores mencionados.

Figura 2.20 – Esquema de um Fotobiorreator tubular em formato de serpentina.



Fonte: (LIAO et al., 2014).

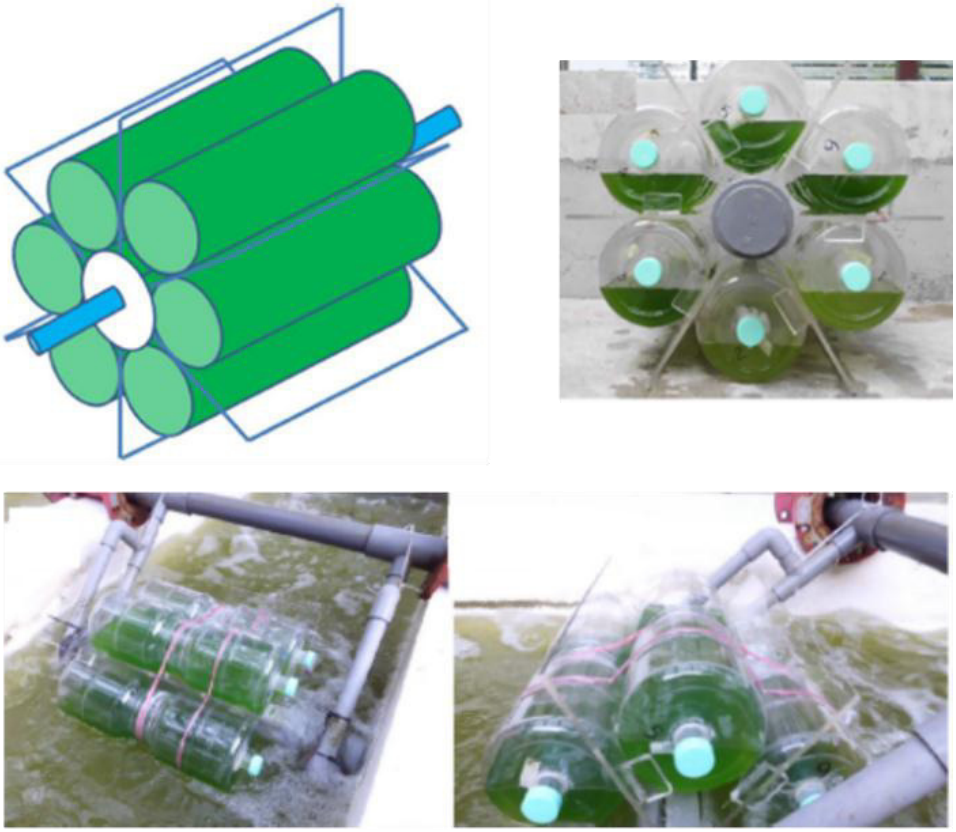
Figura 2.21 – Esquema de um Fotobiorreator tubular espelhado em formato de serpentina.



Fonte: (ILUS; ABU-GOSHI, 2016).

Um fotobioreator não convencional foi desenvolvido por Huang et al.(2016), batizado como flutuador rotativo, constituído de garrafões em disposição hexagonal e utilizado como pás de uma *raceway pond* para o cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta.* A Figura 2.22 apresenta o desenho esquemático e a imagem do fotobiorreator projetado.

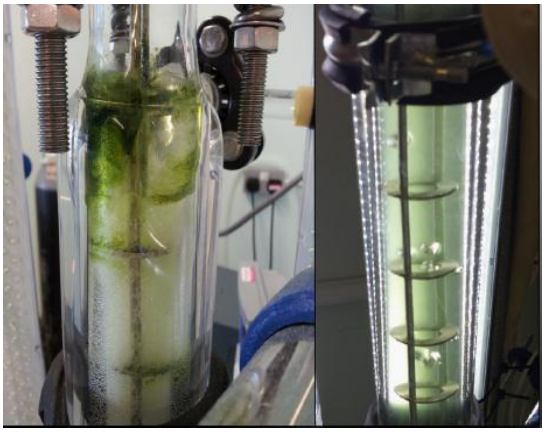
Figura 2.22 – Esquema e fotos de um Fotobiorreator flutuador rotativo.



Fonte: (HUANG et al., 2016).

Um fotobiorreator coluna de bolhas foi adaptado com a inserção de discos em formato de anel em seu interior, de modo a "quebrar" e aumentar o tempo de interação das bolhas com o meio de cultivo da microalga *C. reinhardtii*, num trabalho desenvolvido por Abbott et al. (2015). O sistema foi iluminado externamente conforme pode ser observado na Figura 2.23.

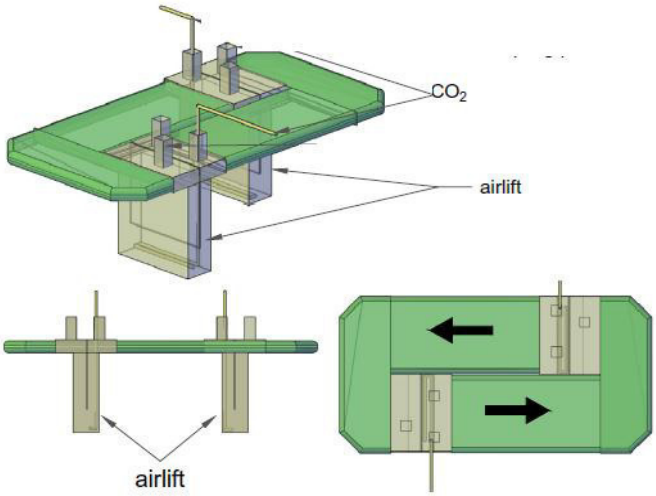
Figura 2.23 – Imagem de um Fotobiorreator de coluna de bolhas com discos internos.



Fonte: (ABBOTT et al., 2015).

Já um protótipo de fotobiorreator horizontal foi proposto por Dogaris et al (2015), no qual foi estabelecida uma junção entre uma configuração tipo *raceway* com outra configuração tipo *airlift* para o cultivo da microalga *Nannochloris atomus*, conforme mostrado na Figura 2.24.

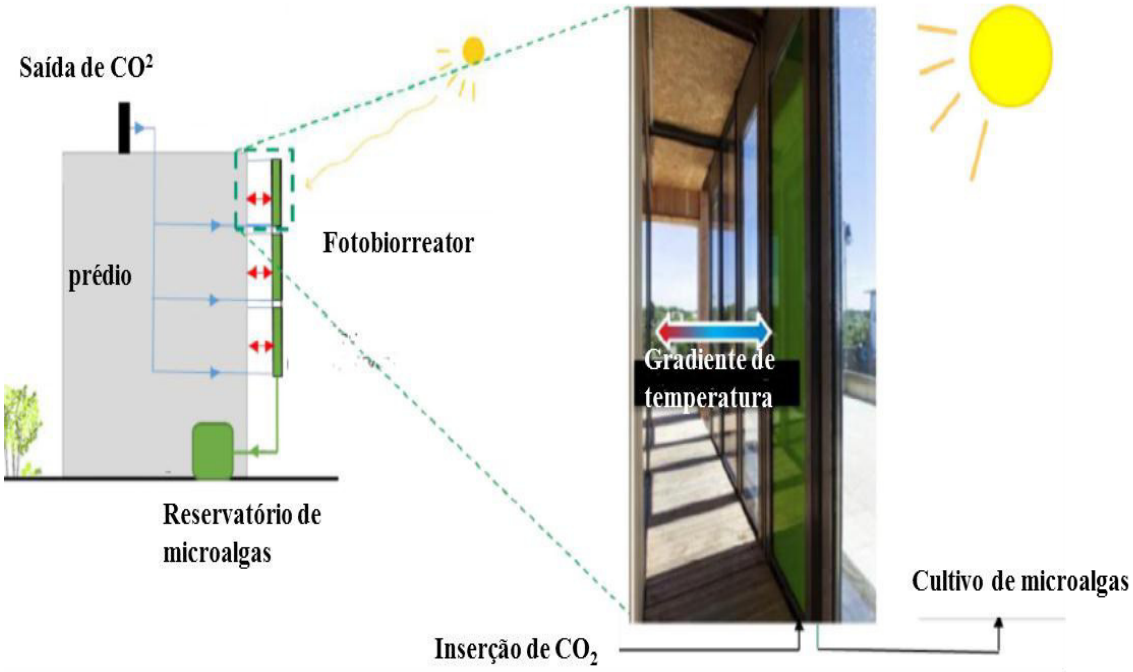
Figura 2.24 – Esquema de um fotobiorreator horizontal associado com um biorreator tipo *airlift*.



Fonte: (DOGARIS et al., 2015).

Outro fotobiorreator interessante foi proposto por Pruvost et. al (2016), no qual um fotobiorreator do tipo placa plana é integrado a um prédio, com a finalidade de produzir biomassa de microalgas. Este fotobiorreator aproveita os gases exauridos da chaminé de um prédio comercial, aumentando assim, a produção de biomassa durante o cultivo. Além disso, proporciona um conforto térmico ao prédio na qual está integrado, pois diminui a temperatura interna do local, devido à absorção da luz solar pelas microalgas enquanto crescem no fotobiorreator, que está localizado ao lado da construção. A Figura 2.25 apresenta o fotobiorretor integrado a uma construção.

Figura 2.25 – Esquema e imagem de um Fotobiorreator integrado a uma construção.



Fonte: (PRUVOST et al., 2016).

Como pôde ser visto, os cultivos microalgais podem ser conduzidos sob as mais diversas configurações de fotobiorreatores, passando por tanques abertos ou fechados, colunas de bolhas, *airlift*, tubular (vertical, horizontal, inclinado ou espiral), combinações de mais de um fotobiorreator ou até mesmo aliados a projetos arquitetônicos como o fotobiorreator do tipo placa, construído ao lado de um prédio industrial que rejeita CO_2 em sua chaminé. A Tabela 2.5 resume alguns trabalhos realizados com diversas microalgas nos mais comuns fotobiorreatores.

Quadro 2.2 – Descrição de alguns processos em que se utilizaram diferentes fotobiorreatores no cultivo de diversas espécies de microalgas.

Configuração	Resumo	Referência
Coluna de bolhas	A microalga marinha *Chlorella minutissima* foi cultivada em fotobiorreator de 20L para o estudo de diversos fatores controlados, como temperatura, CO_2 e nutrientes	Loures et al., (2018)
Tanque aberto (raceway)	Projetou-se um sistema de quebra bolhas para aumentar a eficiência de absorção de CO2 no cultivo de uma espécie mutante do gênero *Chlorella*.	Cheng et al., (2016)
Coluna de bolhas	O cultivo da microalga *Karlodinium veneficum* foi conduzido para avaliar parâmetros como taxa de fluxo gasoso, altura da coluna e diâmetro do dispersor de ar.	López-Rosales et al., (2015)
Tanque aberto (raceway)	O cultivo da microalga *Nannochloropsis* sob condição de estresse nutricional em tanque aberto com a finalidade de acumular lipídeos para a produção de biodiesel.	Perrier et al., (2015)
Tubular	A microalga *Chlorella vulgarisfoi* cultivada em dois estágios como estratégia para acumular lipídeos para a produção de biodiesel	Chen et al., (2014)
Placas planas	Avaliou-se o cultivo da microalga *Chlorella pyrenoidosa* sob diferentes gradientes de iluminação ao longo do fotobiorreator.	Huang et al., (2014)
Coluna de bolhas	A microalga *Nannochloropsis oculata*foi cultivada com a finalidade obter informações sobre o perfil de consumo de CO2	Valdés et al., (2012)

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que são utilizadas diferentes configurações de fotobiorreatores para averiguar a influência de diversos fatores no cultivo de espécies de microalgas, como a utilização do fotobiorreator coluna de bolhas, para averiguar a influência do CO_2 no cultivo da *Nannochloropsis oculata* (VALDÉS et al., 2012).

Em trabalho conduzido por López-Rosales et al. (2015) foram avaliados os parâmetros dimensionais (relação altura / diâmetro e modos de distribuição de ar em seu iterior) durante cultivos da microalga *Karlodinium veneficum.*

No estudo conduzido por Loures et al. (2018), foram avaliadas a influência do nitrato, fosfato, vitaminas, salinidade, temperatura e CO_2 no cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima.*

As *raceways* auxiliaram nos estudos para averiguar a influência do CO_2 no cultivo de microalgas do gênero *Chlorella* e na acumulação de lipídeos da microalga *Nannochloropsis* sob condição de "stress" nutricional visando a produção de biodiesel, nos trabalhos conduzidos por Cheng et al. (2015) e Perrier et al. (2015), respectivamente.

Já o fotobiorreator de placa plana foi utilizado por Huang et al. (2014) sob diferentes intensidades luminosas para estudar tal efeito sobre o cultivo da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

O fotobiorreator tubular possibilitou a Chen et al. (2014) acumular lipídeos na microalga *Chlorella vulgaris* usando a estratégia de cultivá-la em dois estágios, visando a produção de biodiesel.

Desse modo, os projetos de fotobiorreatores são essenciais para o desenvolvimento de processos que visam aumentar a eficiência na formação de biomassa e composição de biocompostos (CARVALHO et al., 2014).

O Quadro 2.3 apresenta alguns estudos com a microalga *Chlorella minutissima* destacando o regime de cultivo, o fotobiorreator utilizado e os fatores estudados.

Com base na Tabela 2.6, nota-se uma predominância de estudos conduzidos em frascos de laboratório em comparação a utilização de fotobiorreatores, sendo estes ainda diversificados, como coluna de bolhas, *airlift*, placas planas e tanques abertos.

Entretanto observa-se uma preferência por regimes fotoheterotróficos, que são providos com fonte adicional de carbono além do atmosférico.

Quadro 2.3 – Descrição de pesquisas realizadas com a microalga *Chlorella minutíssima*.

Regime	Fotobiorreator	Fatores	Referência
fotoautotrófico	coluna de bolhas (20L)	Fonte carbono / nitrato / fosfato / temperatura e salinidade	(LOURES et al., 2018)
fotoheterotrófico	tanque (12L)	absorção de CO_2 de um efluente gasoso (aeração com biogas)	(KHAN et al., 2018)
autotrófico / heterotrófico	Airlift (1,4L) e Flat panel (1,2L)	Luz / temperatura / nitrato / fosfato	(CHAKRABORTY et al., 2016)
fotoheterotrófico	tanque agitado (2L)	Nitrato / fosfato	(ARORA et al., 2016)
autotrófico	Frascos (225 mL)	Nitrato / temperatura	(ÖRDÖG et al., 2016)
mixotrófico	frascos (500 mL)	tratamento de efluentes / Absorção de metais	(YANG et al., 2015)
mixotrófico	frascos (500 mL)	privação de nitrato para acumular lipídeos	(CAO et al., 2014)
mixotrófico	frascos (225 mL)	Luz / fotoperíodo	(STIRK et al., 2014)
autotrófico / fotoheterotrófico	frascos (500 mL)	carbono / nitrato / fosfato	(LI et al., 2011)

Fonte: Autoria própria.

2.6 Iluminação

A luz é a principal fonte de energia para sustentar a vida na Terra, e afeta significativamente os micro-organismos fotossintéticos como as microalgas. Considerando aplicações biotecnológicas, como a formação de biomassa para a produção de bioprodutos, como pigmentos, proteínas, açúcares e lipídeos, por exemplo, os fotobiorreatores utilizados nesses processos devem aproveitar ao máximo o suprimento de luz, seja esta natural ou artificial (FUENTE et al., 2017).

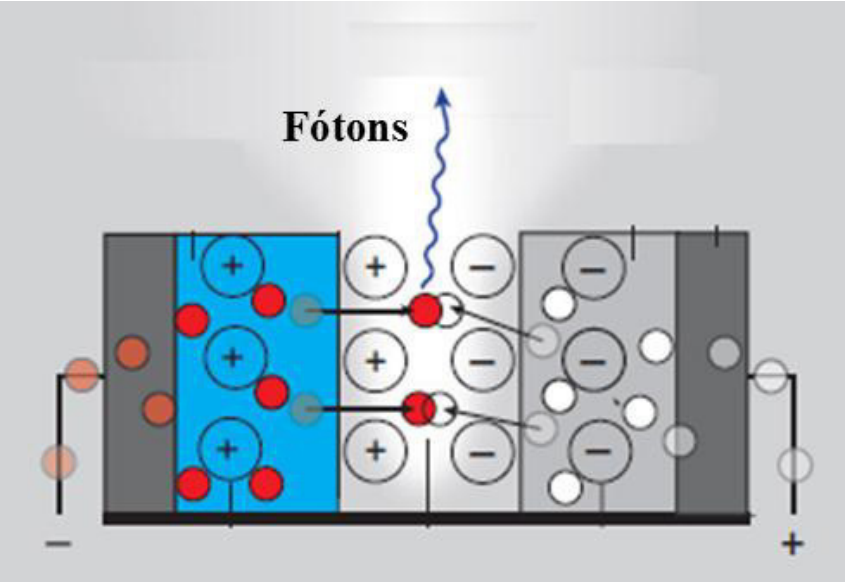
Para muitos fotobiorreatores, principalmente nos de escala laboratorial, utilizam-se iluminação artificial, como as lâmpadas incandescentes e fluorescentes. As lâmpadas incandescentes, que produzem luz pela passagem de corrente elétrica por um filamento de metal, apresentam em média um período de vida de cerca de 750 horas. As lâmpadas fluorescentes, que apresentam em média 25000 horas de vida útil, são compostas por um par de eletrodos em cada extremidade dentro de um tubo de vidro coberto com material a base de fósforo, sendo que a ionização dos gases no interior da lâmpada permite a produção da luz visível (ALMEIDA, 2014; CARVALHO et al., 2014).

Recentemente, os Diodos Emissores de Luz, do inglês “Light Emitting Diode” (LEDs), vem sendo frequentemente utilizados como fonte de luz em fotobiorreatores para o cultivo de microalgas, principalmente por apresentarem baixo consumo energético, além de disporem de uma longa vida útil e mínima geração de calor, possibilitando aos LEDs serem incluídos na categoria de produtos verdes, uma vez que a sua utilização possibilita reduzir as emissões de CO_2 (AVILA-LEON, 2014).

Os LEDs são dispositivos semicondutores, formados por uma bicamada semicondutora, na qual em uma dessas camadas predominam excessos de cargas positivas, enquanto que na outra predominam excessos de carga negativa, conforme ilustrado na Figura 2.26. Durante a polarização da junção da bicamada, ocorre a movimentação dos elétrons emitindo fótons (ALMEIDA, 2014). Como resultado da movimentação dos elétrons, ocorre liberação de energia convertida em fótons (E), inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ), que depende do composto químico empregado e da diferença entre níveis de energia, ajustado multiplicando-se pela constante de proporcionalidade 6,62.10-34J.s (constante de Planck) (h) de acordo com a Equação 2.5 (YAM: HASSAN, 2005).

$$\boldsymbol{E = \frac{h}{\lambda}} \qquad \textbf{(2.5)}$$

Figura 2.26 - Polarização de um dispositivo LED.



Fonte: (SCHULSE et al., 2014).

Assim, é possível relacionar a cor proveniente do LED com a energia dos fótons conforme apresentado na Tabela 2.7 (YAM;HASSAN, 2005).

Tabela 2.4 - Relação entre energia do fóton e cor da luz emitida.

Cor da luz emitida	Comprimento de onda (nm)	Energia do fóton (eV)
Ultravioleta	<390	>3,18
Violeta	390-455	2,75-3,18
Azul	455-490	2,53-2,72
Ciano	490-519	2,41-2,53
Verde	519-570	2,18-2,41
Amarelo	570-600	2,60-2,18
Laranja	600-625	1,98-2,06
Vermelho	625-720	1,72-1,98
Infravermelho	>720	<1,72

Fonte: (YAM; HASSAN., 2005).

A grande versatilidade em se obter um leque de comprimentos de ondas específicos é um dos principais fatores que impulsionaram a utilização de LEDs para iluminar os mais variados cultivos microalgais, flexibilizando estratégias que permitem alterar o comprimento de onda em diversos momentos durante as experimentações para estimular ora o crescimento celular, ora a produção de determinados metabolitos pelas células (SCHULSE et al., 2014).

Nesse sentido, Okumura et al. (2014) conduziram experimentos para avaliar o cultivo da microalga marinha *Botryococcus braunii* para a produção de biodiesel usando LEDs de diferentes intensidades e comprimentos de onda. Os autores verificaram que a iluminação azul forneceu a maior concentração de biomassa (390 $mg.L^{-1}$) enquanto que a iluminação vermelha forneceu 290 $mg.L^{-1}$ de biomassa. A Figura 2.27 ilustra o aparato experimental utilizado.

Figura 2.27 – Esquema e imagem dos Fotobiorreatores iluminados por luzes de LED para o cultivo de *Botryococcus braunii*.

Fonte: (OKUMURA et al., 2014).

Muitos pesquisadores têm divulgado seus resultados com experimentos utilizando luzes de LED no cultivo de microalgas. Observa-se uma maior frequência de trabalhos utilizando microalgas do gênero *Chlorella,* destacando-se as espécies *C. vulgaris* e *C. minutissima,* além de microalgas como *Nannochloropsis salina,* utilizando principalmente as cores azul, branco, vermelho e verde, com diferentes finalidades.

O Quadro 2.4 resume alguns trabalhos que foram desenvolvidos com o uso de LEDs durante os cultivos de diversas espécies de microalgas, e com base no que foi apresentado, foi possível verificar que a utilização dos LEDs branco e azul se relacionam de um modo geral na velocidade e produção de biomassa, independente da espécie estudada, enquanto que as luzes verde e vermelha responderam ao conteúdo lipídico das células das microalgas.

Quadro 2.4 – Relação de algumas publicações sobre o uso de LEDs no cultivo de microalgas.

Espécie	Resumo	Referência
Nannochloropsis salina	Aumentou o teor de lipídeos da microalga utilizando o LED de cor verde numa segunda etapa do cultivo, conFigurando um período de estresse luminoso.	(TA et al., 2016)
Chlorella vulgaris	Observou maior formação de biomassa com a luz branca (1337,5 mg/L) e menor formação com a luz azul (313 mg/L).	(HULTBERG et al., 2014)
Chlorella vulgaris	Utilizou o LED de cor vermelha para melhorar a purificação do biogás oriundo de digestão anaeróbica	(YAN et al., 2013)
Chlorella vulgaris	Avaliou o efeito do fotoperíodo e da intensidade luminosa utilizando LED da cor azul no cultivo microalgal.	(ATTA et al., 2013)
Chlorella minutissima	Alcançou uma velocidade específica de crescimento de 0,13 d-1 durante experimentação da intensidade luminosa (80 – 110 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ utilizando LED de cor branca.	(JENA et al., 2011)
Chlorella sp.	Verificou que a iluminação azul proporcionou maior produtividade de lipídeos em relação a iluminação vermelha	(PAZOS; IZQUIERDO, 2011)

Fonte: Autoria própria.

2.7 Acompanhamento do crescimento celular e colheita da biomassa

Em um cultivo descontínuo de microalgas, o tempo de crescimento pode variar de acordo com as condições impostas, sendo que o acompanhamento do desenvolvimento celular se faz essencial para determinar o momento ótimo para coleta da biomassa formada (BECKER, 1994).

Segundo Lourenço (2006), os principais métodos utilizados para acompanhar o crescimento celular é a contagem de células por microscopia e a medida da densidade óptica por espectrofotometria. A contagem direta por microscopia é a técnica mais simples e tradicional para monitorar o crescimento de microalgas, utilizando-se apenas um microscópio e uma câmara de contagem, como por exemplo, uma câmara de Neubauer, enquanto que o uso da densidade óptica se baseia na absorção física da luz pelas células, quanto mais células estiverem presentes na amostra maior será a absorção de luz e menor será a passagem da luz pela amostra.

Após o período de cultivo deve-se proceder a colheita da biomassa microalgal, por muitos considerada a etapa chave para a produção industrial de biocombustíveis a partir de óleos de microalgas, isso porque estas crescem em culturas muito diluídas, o que faz necessário o processamento de grandes quantidades de líquidos para a sua colheita, com elevado consumo energético (RASTOGI et al.,2018).

Os principais métodos de colheita de microalgas são: floculação, eletrofloculação, biofloculação, sedimentação gravimétrica, flotação, filtração e centrifugação (BARROS et al., 2015).

O processo de floculação envolve a adição de produtos químicos capazes de induzir a agregação de células de microalga seja por neutralização, inversão das cargas elétricas das paredes celulares, ou pela formação de ligações entre as microalgas. Permite recuperar a biomassa com menores custos econômicos quando comparado à centrifugação (RASTOGI et al., 2018)

Os principais agentes floculantes utilizados para a colheita de microalgas são sais como $FeCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$ e $Fe_2(SO_4)_3$, polímeros (quitosana) e bases como NaOH ou KOH, devido à alteração do pH (BARROS et al., 2015).

O processo de eletroflocução, ainda pouco disseminado, se baseia na característica das microalgas de serem eletronegativamente carregadas. Assim, ao adaptar um meio de cultivo com a inserção de eletrodos e permitir a passagem de corrente elétrica pode-se efetuar a separação das células microalgais (BARROS et al., 2015).

De acordo com Barros et al. (2015), no processo de biofloculação, o agente floculante é um microrganismo, como bactérias do gênero *Flavobacterium, Terrimonas* e *Sphingobacterium*, ou fungos (*Rhizopus oryzae, Penicillium expansum, Aspergilus* e *Mucor circinelloides*), formando agregados com as células microalgais e favorecendo a decantação gravimétrica.

A biofloculação pode eliminar a necessidade de agentes floculantes químicos, muito embora para alguns casos seja necessária a adição de $CaCl_2$ para garantir a eficiência do processo (BARROS et al., 2015).

O processo de flotação pode ser definido como o "inverso" da sedimentação, onde bolhas de ar promovem a ascensão das células do cultivo realizando a sua separação do meio líquido. Porém, cultivos de microalgas marinhas dificilmente sofrem flotação, devido à alta salinidade do meio (BARROS et al., 2015).

O método de filtração consiste em passar o meio de cultivo por uma membrana de poros reduzidos que retêm as células microalgais e permitem apenas a passagem do meio líquido (RASTOGI et al., 2018).

Segundo Lourenço (2006), na filtração de pequenos volumes, utiliza-se um aparato de filtração como um frasco de Kitasato ou similar, porém em um cultivo de grande escala, a separação de enormes volumes de microalgas para posterior processamento da biomassa somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou filamentosas, que são facilmente retidas no filtro, desprendendo pouco tempo de processo.

Com relação ao tempo de colheita, a sedimentação gravimétrica é um processo lento, que envolve a separação das células de microalgas do meio de cultivo pela ação da força gravitacional, resultando um processo simples, porém com baixa eficiência (LOURENÇO, 2006).

Em contrapartida, a centrifugação que utiliza um equipamento de sedimentação de células que atua pela ação da força centrífuga, trata-se de um processo rápido de recuperação de biomassa, porém, requer alto consumo de energia. Por esta técnica a biomassa é concentrada sem a adição de produtos químicos, conservando suas características originais (LOURENÇO, 2006).

O Quadro 2.5 apresenta as principais vantagens e desvantagem de cada método de colheita das microalgas (BARROS et al., 2015).

Quadro 2.5 - Vantagens e desvantagens dos métodos de colheita de microalgas.

Método	Vantagens	Desvantagens
Coagulação Floculação Química	• Método simples e rápido; • Baixo custo energético; • Elevado rendimento de recuperação	• Custos elevados dos floculantes químicos; • Riscos de toxicidade para a biomassa; • Dificuldade de reutilização do meio de cultivo
Biofloculação	• Não oferece risco de toxicidade para a biomassa; • Permite a reutilização do meio de cultivo	• Riscos de contaminação microbiana; • Alterações na composição celular;
Sedimentação	• Método simples e sem custo	• Elevado tempo de processo; • Riscos de deterioração da biomassa
Flotação	• Método de baixo custo; • Curto período de processo	• Difícil implementação para microalgas marinhas
Eletrofloculação	• Não requer adição de reagentes químicos; • Aplicável a uma grande variedade de microalgas	• Alto custo energético e de equipamentos
Filtração	• Eficiência de colheita elevada	• Longo período de processo; • Requer limpezas ou trocas regulares de menbranas
Centrifugação	• Método rápido e eficiente; • Aplicável a espécies de baixa densidade	• Custo elevado; • Alto consumo energético; • Riscos de cisalhamento das células

Fonte: Adaptado de Barros et al. (2015).

2.8 Extração de lipídeos

Os óleos das microalgas podem ser extraídos de modo similar a outras biomassas oleaginosas, que usualmente utilizam a extração física pela a adição de um solvente químico para melhorar o processo de extração, sendo que solventes como o hexano e o metanol aparecem como os mais utilizados (SUALI; SARBATLY, 2012).

A extração de óleo com solvente é um processo de transferência de constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a biomassa) para um solvente, num processo meramente físico, sem nenhuma reação química. A extração com solventes é o método mais econômico atualmente e a utilização do hexano e do clorofórmio têm tornado o método mais rápido e eficiente para a extração lipídica das mais diversas biomassas. Porém, a presença desses solventes químicos pode afetar a composição lipídica do óleo extraído (RASHID et al., 2014).

Prensas mecânicas tais como parafuso e pistão, dentre outras, podem romper as células e liberar o óleo, porém com baixa eficiência. Por outro lado, quando combinada com o uso de solventes orgânicos podem atingir eficiência de extração de óleo na ordem de 95% (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Sais em altas concentrações podem ocasionar uma brusca alteração na pressão osmótica, podendo levar ao rompimento das células e liberação do óleo de seu interior, num método conhecido como “choque osmótico” (RASHID et al., 2014).

Um método que vem recebendo notória atenção é a extração supercrítica, que utiliza fluídos acima do ponto crítico de temperatura e pressão, conferindo propriedades como baixa viscosidade e elevada difusividade, permitindo alcançar maior eficiência de extração lipídica. Nesse contexto, o uso do CO_2 como fluído supercrítico é altamente atrativo devido à alta seletividade, não toxicidade e curto período de processo. O único inconveniente é o elevado custo associado à instalação de equipamentos adequados para operarem sob condições seguras em alta temperatura e pressão (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Na busca de processos ambientalmente amigáveis, a extração enzimática é altamente recomendável, uma vez que utiliza enzimas como pectinase e celulase, para degradar a parede celular, conferindo extrações altamente eficientes sem afetar a composição lipídica microalgal, diferentemente do método que emprega solventes químicos orgânicos (RASHID et al., 2014). Em contrapartida são métodos ainda empregados apenas em escala de

laboratório, devido a altos custos envolvidos com a aquisição de enzimas. (SUALI; SARBATLY, 2012).

2.9 Síntese de biodiesel

O biodiesel é o combustível substituto natural e renovável do diesel de petróleo. É produzido a partir de óleos de vegetais como a soja, palma, girassol e pinhão manso e/ou gordura animal, como o sebo bovino e a gordura de frango. Ou seja, quaisquer fontes que disponham de lipídeos podem, em tese, ser úteis à produção de biodiesel (SKORUPSKAITE, MAKAREVICIENE, GUMBYTE, 2016; AHMAD et al., 2011).

Matérias-primas de primeira geração como a soja, a palma e o girassol não são consideradas socialmente sustentáveis porque competem com a demanda de alimentos. Em contrapartida, matérias-primas de segunda geração como sebo bovino, óleos residuais de fritura e gordura de frango, se destacam como alternativas para a produção de biodiesel, além do pinhão manso, que cresce em regiões semiáridas, onde outras fontes de oleaginosas não são capazes de crescer e, assim, não competem com a cadeia de alimentos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

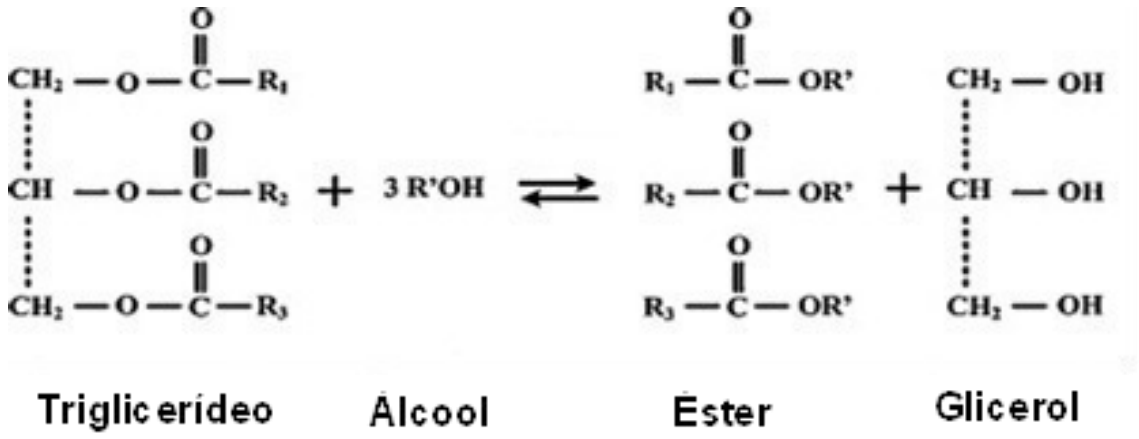
Por outro lado, as microalgas, assim como as cianobactérias, pertencem ao grupo de matérias-primas de terceira geração. Estas se apresentam como uma alternativa promissora, pois são capazes de acumular altos teores de lipídeos aliado à elevadas velocidades de crescimento e produtividade de biomassa comparada às oleaginosas convencionais, além de não competir com a cadeia de alimentos (DA RÓS, 2012).

O biodiesel pode ser definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos obtidos por transesterificação de triacilglicerídeos dos óleos vegetais ou gordura animal, ou pela reação de esterificação de ácidos graxos livres resultando ésteres alquílicos de ácidos graxos e água. Ambas as reações ocorrem na presença de álcoois e catalisador (AMARO, GUEDES; MALCATA, 2011).

Os álcoois são considerados os agentes de transesterificação, podendo ser álcool metílico (metanol), etílico (etanol), propílico, butílico ou amílico. O metanol é o álcool mais utilizado devido ao seu baixo custo e suas propriedades físico-químicas (polaridade e menor cadeia carbônica) enquanto que o etanol vem se destacando pelo seu potencial de baixa toxicidade e fácil disponibilidade (PINTO et al., 2005).

A transesterificação é uma reação de múltiplos estágios, incluindo três estágios reversíveis em série, de modo que triglicerídeos são convertidos a diglicerídeos, em seguida diglicerídeos são convertidos em monoglicerídeos e por fim monoglicerídeos são convertidos em ésteres (biodiesel) e glicerol (co-produto). Estequiometricamente a reação de transesterificação requer 3 mols de álcool para 1 mol de triacilglicerídeo, sendo utilizado um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio no sentido de formação dos produtos, por se tratar de uma reação reversível. A reação de esterificação requer 1 mol de álcool para 1 mol de ácido graxo, e também necessita de excesso de álcool para favorecer o sentido de formação dos produtos, conforme apresentado na Figura 2.28 (SALAM, VELASQUEZ-ORTA, HARVEY, 2016)

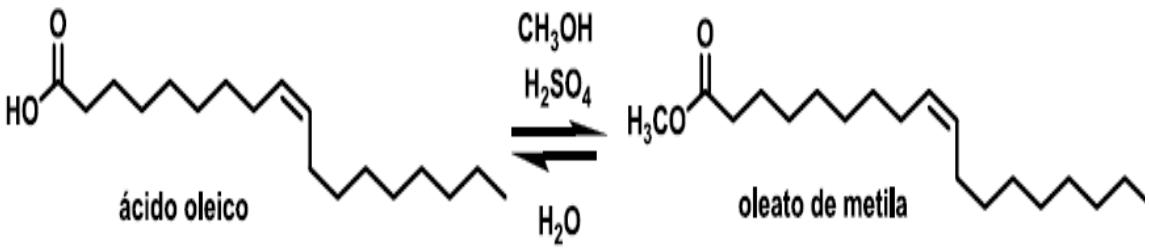
Figura 2.28 - Reação de transesterificação pela qual se obtém os ésteres do biodiesel.



Fonte: (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

As reações de síntese do biodiesel podem ser catalisadas homogeneamente ou heterogeneamente. Os catalisadores homogêneos podem ser ácidos (ácido sulfúrico, sulfônico e clorídrico) ou alcalinos (hidróxidos de sódio ou de potássio), enquanto os catalisadores heterogêneos podem ser enzimas ou compostos metálicos. Para a determinação do catalisador, o índice de acidez é a principal característica do óleo utilizado a ser observada, uma vez que altas quantidades de ácidos graxos não permitem a catálise alcalina devido à formação de sabão no meio reacional. Nesse caso, o uso de catalisadores ácidos acaba sendo indicado, conforme apresentado no esquema da Figura 2.29 (DEMIRBAS, 2010).

Figura 2.29 - Esquema de reação de esterificação via catálise ácida.



Fonte: (DEMIRBAS, 2010).

Na catálise enzimática, enzimas como as lipases, presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias, possuem a função biológica de acelerar a hidrólise de gorduras e óleos vegetais, liberando ácidos graxos, monoglicerídeos, diglicerídeos e glicerol (VIEIRA et al., 2006).

Comparado ao processo via catalisadores químicos, as enzimas apresentam algumas vantagens como a alta seletividade, faixa de temperatura de reação entre 30 e 40 ºC e pH de ação entre 4 e 9. Em contrapartida, requer longos períodos de reação para atingir altas conversões e apresentam custos elevados para a sua obtenção (VIEIRA et al., 2006)

Leung, Wu e Leung (2010) explicam que de um modo geral existirão vantagens e desvantagens associadas à escolha do tipo de catalisador. Os catalisadores alcalinos apresentam como principais vantagens, a alta atividade catalítica, baixo custo e condições operacionais moderadas, porém necessita que o óleo utilizado apresente baixo índice de acidez para evitar a formação de sabão. Os catalisadores ácidos têm a desvantagem de corroer equipamentos e exigirem elevados períodos de reação, entretanto evitam a formação de sabão. Os catalisadores heterogêneos (enzimas e compostos metálicos) mostram-se altamente seletivos e permitem a sua reciclagem, mas possuem custos elevados.

O óleo extraído de microalgas marinhas apresenta elevado índice de acidez, indicando a catálise ácida como a mais adequada para a produção de biodiesel, conforme pode-se observar no Quadro 2.6, que destaca o processo de síntese de biodiesel via catálise ácida utilizado por alguns pesquisadores (LOURES et al., 2018; AMARAL et al., 2015; MIAO, 2006).

Quadro 2.6 - Processos de síntese de biodiesel a partir de lipídeos de algumas espécies de microalgas do gênero *Chlorella.*

Microalga	Catalisador	Observações	Referência
Chlorella minutissima	H_2SO_4	Razão molar (álcool:lipídeo) 9:1, 90°C e 8h	(LOURES et al.,2018)
Chlorella sp	H_2SO_4	Razão molar (álcool:lipídeo) 30:1, 100°C e 4h	(LEMÕES, 2011)
Chlorella protothecoides	H_2SO_4	Razão molar (metanol:lipídeo) 56:1, 30°C e 4h	(MIAO, 2006)
Chlorella sp.	H_2SO_4	Razão molar (álcool:lipídeo) 315:1, 90°C e 12h	(EHIMEM et al., 2010)

Fonte: Autoria própria

A síntese de biodiesel a partir dos óleos microalgais é realizada em um reator no qual a mistura álcool e catalisador reagem com o triglicerídeo e/ou ácidos graxos presentes no óleo da microalga. Após a reação a mistura reacional é conduzida para um tanque de separação para a formação da camada superior constituída por metil estér, excesso de álcool e catalisador (ácido ou base) e formação da camada inferior, predominantemente glicerol (SUALI ; SARBATLY, 2012).

3 OBJETIVOS

Geral

- Propor a aplicabilidade de um fotobiorreator integrado (coluna de bolhas – tubular) internamente iluminado para o cultivo fotoautotrófico da microalga marinha *Chlorella minutissima* visando a produção de biomassa e o acúmulo de lipídeos na biomassa formada.

Específicos

- Estabelecer um sistema de cultivo de microalgas baseado em um fotobiorreator integrado (coluna de bolhas – tubular) internamente iluminado;
- Estudar o efeito da cor da iluminação, fotoperíodo, aeração, vazão de circulação do meio de cultivo e privação nutricional sobre a concentração de biomassa, produtividade em biomassa, teor de lipídeos e produtividade lipídica, durante o cultivo foto-autotrófico de *Chlorella minutissima* e propor o melhor ajuste de cada parâmetro para o cultivo no fotobiorreator integrado;
- Comparar o fotobiorreator integrado proposto com os fotobiorreatores tubular e de coluna de bolhas em termos de produção de biomassa microalgal e de velocidade específica de crescimento de *Chlorella minutissima*;
- Analisar o perfil dos ácidos graxos presentes no material lipídico extraído da biomassa microalgal obtida pelos cultivos iluminados com as cores azul, branca e vermelha;
- Converter o óleo extraído da biomassa microalgal em biodiesel via catálise ácida e avaliar a qualidade do biodiesel obtido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécie da microalga empregada nos experimentos

Todos os experimentos foram realizados com a linhagem da microalga marinha *Chlorella minutissima*, isolada em Cabo Frio - RJ, pertencente ao Banco de Algas Marinhas do Instituto Oceanográfico da USP, gentilmente doada pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo. A cultura foi mantida em meio f/2 sem sílica (GUILLARD, 1975), sob iluminação fornecida por uma lâmpada fluorescente de 15 W ligada a um temporizador para o controle do fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuro

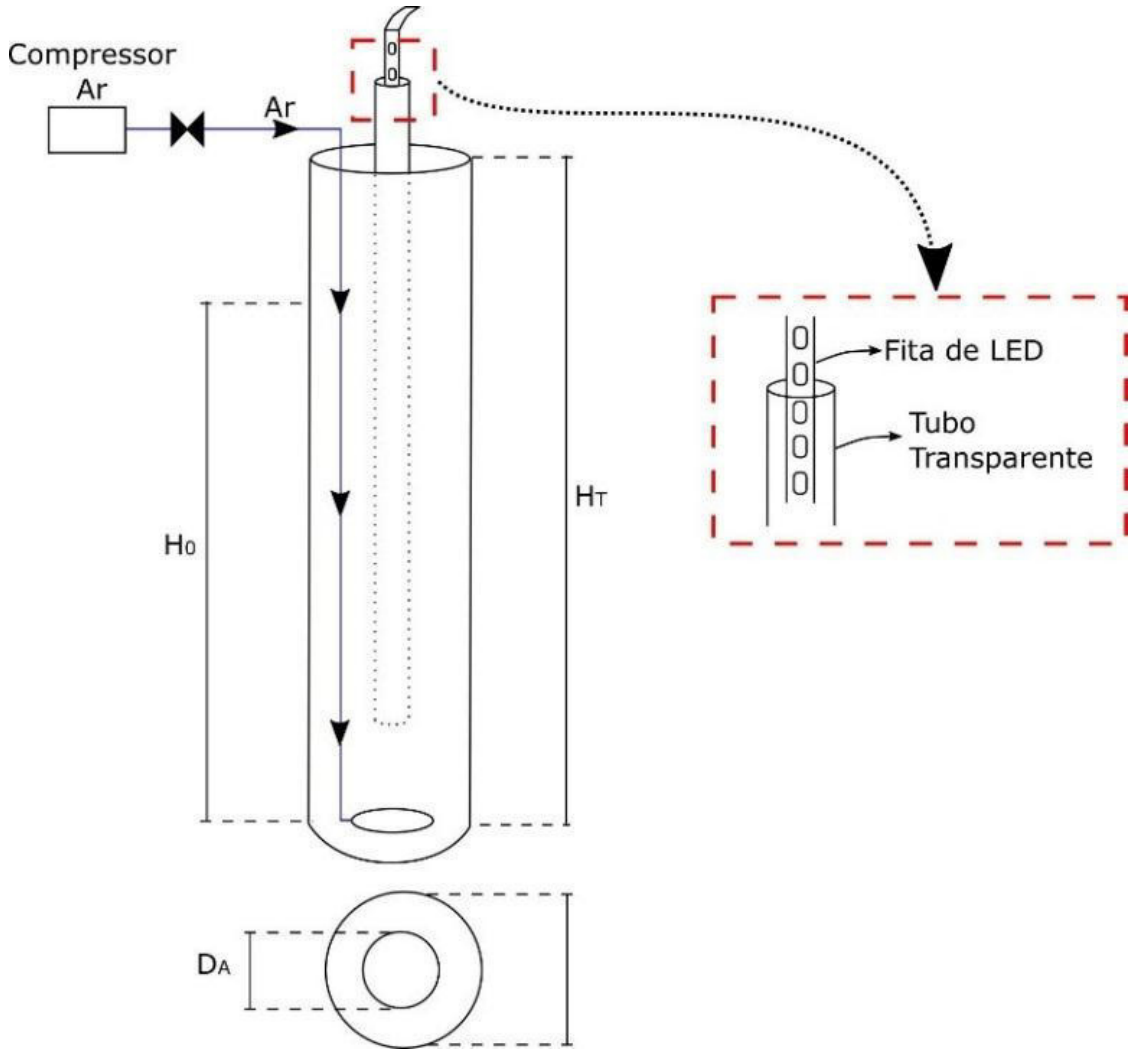
4.2 Fotobiorreator Integrado internamente iluminado

Foi montado um sistema composto por três fotobioreatores integrados, sendo internamente iluminados. Cada fotobiorreator consistiu numa integração de uma configuração tubular envolta numa configuração coluna de bolhas, ambas com iluminação interna fornecida por fitas de LED. O meio de cultivo permaneceu em constante recirculação entre as duas configurações durante o cultivo.

A parte do fotobiorreator que configura uma coluna de bolhas, consistiu de um cilindro acrílico com diâmetro interno de 150 mm (D_{BC}), 3mm de espessura e 1300 mm de altura total (H_T), sendo que a altura útil de trabalho foi de 1000 mm (H_0), correspondendo a um volume útil de 18 L. No interior do cilindro de acrílico foi inserido um tubo transparente de PVC onde foi abrigada a fita de LED que forneceu a iluminação dentro do cilindro. A aeração foi realizada por inserção de ar comprimido utilizando um compressor de ar BOYU (modelo ACQ-003), direcionado a base da coluna e distribuído por um aspersor de 100 mm de diâmetro.

A Figura 4.1 apresenta um desenho esquemático da configuração coluna de bolhas que compõe o fotobiorreator integrado, detalhando a iluminação interna que foi garantida por fita de LED, abrigada em tubo transparente de PVC, disposta no interior da coluna de bolhas.

Figura 4.1 - Desenho esquemático da configuração coluna de bolhas que compõe o fotobiorreator integrado internamente iluminado.

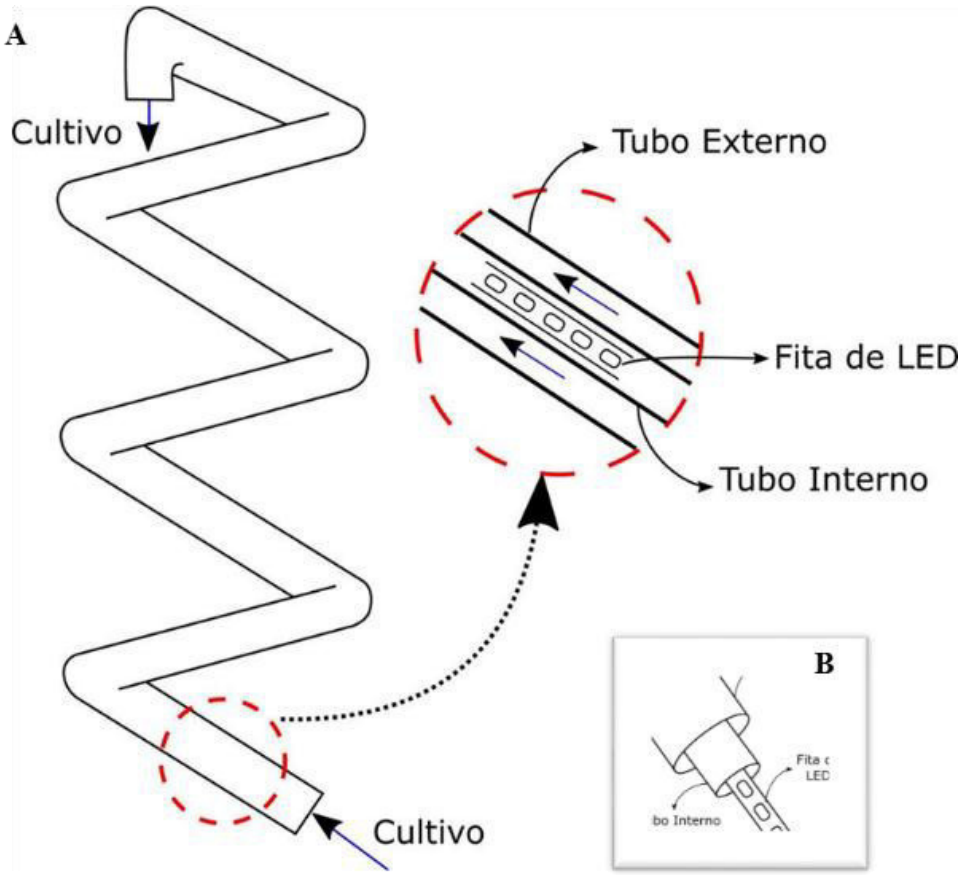


Fonte: Autoria própria

A configuração tubular consistiu de um tubo transparente flexível de PVC com 25 mm de diâmetro interno, 5 mm de espessura e 5000 mm de comprimento, que foi disposto ao redor da coluna de acrílico anteriormente descrita. Dentro desse tubo flexível, foi inserido outro tubo flexível e transparente, também de PVC e de diâmetro menor (20 mm), que alojou uma fita de LED para iluminar o interior de toda a parte tubular do fotobiorreator.

A Figura 4.2 apresenta um desenho esquemático que ilustra a configuração tubular que compõe o fotobiorreator integrado, detalhando o tubo transparente concêntrico interno que abriga a fita de LED para garantir a iluminação do meio de cultivo que percorrerá esta configuração tubular do fotobiorreator integrado.

Figura 4.2 - Desenho esquemático da configuração tubular que compõe o fotobiorreator integrado (A), com detalhe da iluminação interna dentro do tubo menor (B).

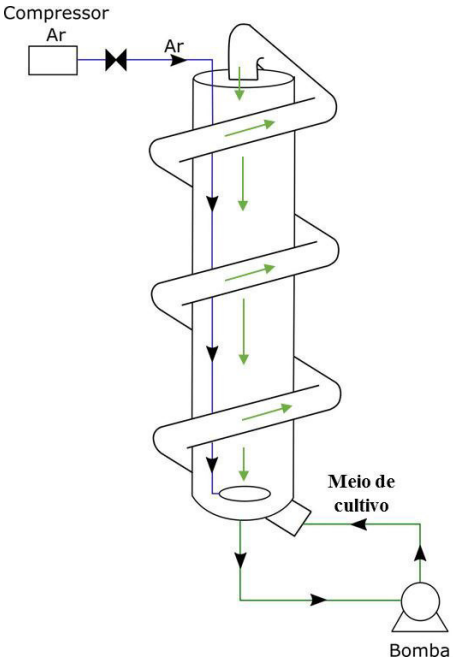


Fonte: Autoria própria.

Unindo as duas configurações (coluna de bolhas e tubular) foi constituído o fotobiorreator integrado, completamente iluminado por dentro, na qual o meio de cultivo com a microalga permaneceu recirculando em seu interior, atravessando a configuração tubular e a configuração coluna de bolhas continuamente durante todo o período de cultivo.

A Figura 4.3 ilustra esquematicamente o fotobiorreator integrado destacando com as setas verdes o sentido de recirculação do meio de cultivo, promovido por uma bomba centrífuga (BOMAX modelo 30PX-T), e as setas em azul indicam a aeração fornecida por compressor (modelo ACQ-003).

Figura 4.3 - Ilustração esquemática do fotobiorreator integrado internamente iluminado usado para o cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.



Fonte: Autoria própria.

Assim, foram construídos três fotobiorreatores num único sistema na qual cada fotobiorreator integrado funcionou com uma iluminação (azul, branco e vermelho) conforme imagem mostrada na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Sistema com os três fotobiorreatores integrados internamente iluminados: (A) antes e (B) durante cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.

Fonte: Autoria própria

4.3 Sequência experimental

4.3.1 Avaliação das variáveis de cultivo no fotobiorreator integrado

Os cultivos foram conduzidos à 27 ˚C, subdivididos em duas fases, sendo que a primeira fase ocorreu com a inoculação das microalgas em meio com condição suficiente de nutrientes, conforme meio f/2 sem sílica (GUILLARD, 1975) e estendeu-se até o início da fase estacionária ou verificação de queda na concentração celular, configurando o término da fase 1. Ao fim da fase 1, retirou-se uma amostra de 1 L de cultivo para quantificação do teor de lipídeos atingido na primeira fase.

A segunda fase iniciou-se com a adição de 1 L de meio de cultivo fresco com concentração de nutrientes suficientes para garantir a concentração prevista no meio f/2 sem sílica (GUILARD, 1975) no volume total do fotobiorreator, com exceção da fonte de nitrato, que foi adicionada em concentração 70% menor, configurando uma condição de estresse para o cultivo, com o intuito de estimular o acúmulo de lipídeos. A fase 2 foi conduzida até ser observada a fase estacionária ou a verificação de queda na concentração celular.

Durante todos os experimentos foram verificadas as seguintes variáveis manipuladas (fatores): Cor da iluminação, fotoperíodo, aeração e vazão de circulação de meio de cultivo.

A cor da iluminação foi fornecida por três diferentes fitas flexíveis de LED da marca Ciberlux, com colorações distintas, azul, branco e vermelho. O fotoperíodo consistiu no tempo do ciclo claro/escuro, ao qual o cultivo foi submetido, podendo ser ajustado em três ciclos distintos, controlado pelo uso de temporizadores: (12 h claro :12 h escuro); (1 h claro : 1 h escuro) e (24 h claro : 0 h escuro). A aeração foi determinada dividindo-se a vazão de ar comprimido injetado pelo volume de meio de cultivo utilizado, configurando: 0,3 vvm; 0,4 vvm e 0,5 vmm. A vazão de circulação do meio através do fotobiorreator foi ajustada com o auxílio de uma válvula reguladora que permitiu estabelecer três vazões distintas: 5,1 L min^{-1}; 6,6 L min^{-1} e 9,0 L min^{-1}.

De acordo com os fatores selecionados para o estudo, bem como os níveis de operação, foram conduzidos cultivos da microalga *Chlorella minutissima* conforme previsto pela matriz de planejamento experimental de Taguchi, perfazendo nove experimentos realizados em duplicata.

A Tabela 4.1 apresenta a codificação dos fatores em 3 níveis de operação, utilizada para a montagem da matriz de planejamento experimental (Taguchi L_9).

Tabela 4.1 - Fatores de operação do fotobiorreator integrado durante os ensaios de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e a respectiva codificação dos níveis.

	Fatores	Níveis 1	2	3
A	Cor da iluminação	azul	Branco	vermelho
B	Fotoperíodo (h claro/ h escuro)	12h:12h	1h:1h	24h:0h
C	Aeração (vvm)	0,3	0,4	0,5
D	Vazão ($L.min^{-1}$)	5,1	6,6	9,0

Fonte: Autoria própria.

Como variáveis respostas, foram avaliadas a concentração de biomassa (X), a produtividade volumétrica de biomassa (P), o teor de lipídeos (L) e a produtividade lipídica da biomassa (PL), para as fases 1 e 2 dos cultivos, sendo os conjuntos de dados obtidos a partir do planejamento da matriz ortogonal de Taguchi L_9, conforme Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L9.

	Variáveis Manipuladas Fatores				Variáveis respostas			
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**X** (mgL^{-1})	**P** ($mgL^{-1}d^{-1}$)	**L** (%)	**PL** ($mgL^{-1}d^{-1}$)
1	1	1	1	1				
2	1	2	2	2				
3	1	3	3	3				
4	2	1	2	3				
5	2	2	3	1				
6	2	3	1	2				
7	3	1	3	2				
8	3	2	1	3				
9	3	3	2	1				

Fonte: Autoria própria.

A condição experimental definida pela análise estatística dos resultados, obtidas ao fim dos experimentos conduzidos segundo o planejamento experimental, que melhor

favoreceu a variável resposta desejada, foi empregada para a realização de um ensaio confirmatório.

4.3.2 Avaliação da influência da cor da iluminação sobre o perfil de ácidos graxos dos lipídeos da biomassa de *Chlorella minutissima*

Dentre os experimentos conduzidos de acordo com o planejamento de Taguchi, separou-se aqueles que resultaram as maiores produtividades lipídicas, cada um referente à uma das três cores que foram empregadas na iluminação dos cultivos da microalga *Chlorella minutissima* no fobiorreator integrado, para se avaliar a influência desta variável (cor da iluminação) sobre o perfil dos ácidos graxos presentes no material lipídico.

4.3.3 Síntese do biodiesel

A síntese do biodiesel (ésteres de etila) foi realizada via catálise ácida homogênea em balão de vidro durante 8 h a 80 ºC, sob agitação magnética constante. Foi utilizada uma proporção molar de (1:30) de óleo extraído da biomassa de *Chlorella minutissima* e etanol anidro, com 3% (m/m) de ácido sulfúrico como catalisador, com base na massa total dos reagentes envolvidos.

Ao final da etapa de síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a um resfriamento à temperatura ambiente (27 ˚C), por aproximadamente uma hora. Em seguida foi adicionado água destilada e hexano, e o conteúdo foi transferido para um funil de decantação e deixado em repouso até se verificar a separação das fases. A fase inferior, composta por glicerol e água de lavagem, foi descartada e a fase superior, composta pelo biodiesel, foi submetida à centrifugação (1570 x g por 15 min) e em seguida à evaporação em rota-evaporador, para a retirada de álcool e água remanescentes. Posteriormente foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro para realizar a etapa de secagem (ANDRADE et al., 2014).

4.3.4 Teste Comparativo

Foi realizado um teste comparativo entre o fotobioreator integrado, o fotbioreator coluna de bolhas e o fotobiorreator tubular, todos iluminados internamente com a cor, o fotoperíodo, a aeração e a vazão de recirculação (para os fotobioreatores integrado e coluna de bolhas) definidos pelo melhor ajuste para o cultivo proposto na análise estatística dos resultados experimentais. Salienta-se que para o teste comparativo envolvendo o

fotobiorreator tubular não foi incluída a variável aeração, tendo em vista que esta condição não se aplica a tal tipo de biorreator.

4.4 Colheita da biomassa

A colheita da biomassa foi realizada por floculação induzida por sulfato de alumínio (solução 1,0 N). Após a floculação, a biomassa foi submetida à filtração em papel de filtro qualitativo e em seguida foram realizadas três lavagens da biomassa com solução de formiato de amônio 6 M, para a retirada do sal marinho utilizado como componente do meio de cultivo. A biomassa foi então, disposta em vidro de relógio para secagem em estufa a 60 ºC durante 48 h.

4.5 Extração dos lipídeos

Os lipídeos foram extraídos de amostras da biomassa úmida (retida na etapa de filtração) segundo uma adaptação da metodologia de Bligh and Dyer (1959), utilizando banho ultrassônico. Para a extração foram utilizados 100 mg da amostra de biomassa colocadas em tubos de ensaio de 50 mL e solubilizados em solução solvente formada por clorofórmio e metanol, na proporção de 1:1. Em seguida os tubos foram colocados em um banho ultrassônico (Modelo Unique USC1800) e submetidos a extração lipídica a 45 ºC por 1 hora.

Após esse tempo, foi efetuada a filtração da mistura em papel de filtro qualitativo, para retenção da biomassa, e o filtrado recebeu a adição 6 mL de uma mistura clorofórmio e água (1:1) para promover a separação da fase apolar (lipídica) da fase polar. Esta separação foi acelerada centrifugando-se a mistura em centrífuga Daiki (modelo 80-2B) a 2000 rpm por 5 minutos. Por fim, o solvente foi evaporado em rota-evaporador a 60 ºC.

4.6 Metodologia analítica

4.6.1 Acompanhamento do crescimento celular

Todos os cultivos foram acompanhados diariamente por leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Bel Photonics), selecionando-se o comprimento de onda de 570 nm, e contagem celular em câmara de Neubauer (LOURENÇO, 2006). As leituras de absorbância foram convertidas na respectiva concentração de biomassa seca (*N*)

empregando-se o trecho linear de uma curva de calibração previamente determinada, correspondente à equação 4.1.

$$N(mgL^{-1}) = 0{,}015701 + 0{,}722659.OD_{570} \qquad (\mathbf{4.1})$$

Para os ensaios correspondentes ao teste comparativo entre os fotobiorreatores Integrado proposto, coluna de bolhas e tubular convencionais (item 4.5.4), o crescimento foi avaliado por contagem de células da microalga em câmara de Neubauer, observada em microscópio óptico, após a devida diluição das amostras. As concentrações foram obtidas multiplicando-se a média da contagem de cinco campos pelo fator da câmara e em seguida pela respectiva diluição da amostra.

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) foram determinadas empregando-se a planilha desenvolvida por Gombert (2001), para o programa EXCEL, para a qual os dados de entrada são o tempo e a respectiva concentração de biomassa obtida da curva suavizada de concentração de biomassa em função do tempo. Salienta-se que a planilha utiliza como estratégia de cálculo o método geométrico de Le Duy e Zajic para o cálculo de derivadas que, no caso de cultivos celulares, correspondem às velocidades de crescimento.

As produtividades volumétricas de biomassa (*P*) foram calculadas dividindo-se a concentração de biomassa máxima pelo tempo de cultivo correspondente, usando-se a equação 4.2 onde (*t*) representa o tempo, N_i representa a concentração de biomassa no tempo t_i, e N_0 representa a concentração de biomassa inicial.

$$P(mg\,.L^{-1}.\ d^{-1}) = \frac{N_i - N_0}{(t_i - t_0)} \qquad (\mathbf{4.2})$$

4.6.2 Determinação do teor de lipídeos e produtividade lipídica

A partir das extrações lipídicas realizadas ao final das fases 1 e 2 de cada cultivo, foram determinados os teores de lipídeos (*L*), usando-se a equação 4.3, que permitiu calcular a produtividade lipídica (*PL*) pela equação 4.4

$$L(\%) = \frac{massa\ do\ óleo\ extraído\ .100}{massa\ da\ biomassa\ usada\ na\ extração} \qquad (\mathbf{4.3})$$

$$PL(mg\,.L^{-1}\,.\,d^{-1}) = \frac{P\,.L\%}{100} \qquad (\mathbf{4.4})$$

4.6.3 Análise do perfil de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos para os lipídeos extraídos das biomassa oriundas dos cultivos realizados foi determinada por cromatografia de fase gasosa, segundo metodologia da AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS (2004), empregando cromatógrafo de fase gasosa (CGC Agilent 6850 Series GC System), equipado com coluna capilar do tipo DB-23 Agilent (50% cianopropil – metilpolisiloxano, dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme), operando com rampa de aquecimento de 110 °C (5 min), 110 – 215 oC (5 °C/min) e 215 °C– 24 min e hélio como gás de arraste.

4.6.4 Quantificação dos ésteres de etila

Os ésteres de etila obtidos por via química foram determinados por cromatografia de fase gasosa com detector FID (Varian CG, modelo 3800) sob condições previamente determinadas por Urioste et al. (2008), enquanto que os glicerídeos formados foram determinados por cromatografia de fase líquida (Agilent, modelo 1200) com coluna Gemini C-18 (5 µm, 150 x 4,6 mm) a 40 ºC, usando uma mistura de acetonitrila (80%) e metanol (20%) como fase móvel num fluxo volumétrico de 1 mL min $^{-1}$ por 6 minutos, seguido por 1,5 mL min $^{-1}$ durante 30 minutos e finalizando com 3,0 mL min $^{-1}$ por 5 minutos As amostras foram previamente dissolvidas em uma mistura de etil acetato/hexano (1:1), filtradas em membranas de 0,22 µm (Millipore) e injetadas num volume de 10 µL (ANDRADE et al.,2014).

4.6.5 Propriedades estimadas do biodiesel baseadas no perfil dos ácidos graxos obtido

O grau de insaturação, o índice de saponificação, o índice de Iodo, o número de cetano, o ponto de entupimento a frio, a viscosidade cinemática e a densidade do possível biodiesel sintetizado a partir do óleo extraído de *Chlorella minutissima* utilizado neste trabalho foram estimados pelo programa "Biodiesel Analyzer© Ver1.1" com base nas equações descritas por Talebi et al. (2013).

4.6.6 Metodologia de análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados seguindo-se as estratégias rotineiras por meio de cálculos de porcentagem de teor lipídico e quantidade de biomassa microalgal após cada experimento realizado. Os valores de influência dos fatores, fotoperíodo, aeração, vazão de circulação de meio e cor da iluminação, foram dispostos em gráficos ou Tabelas convenientes para a análise do comportamento destas variáveis durante o processo de tratamento empregado.

A análise estatística da influência dos fatores sobre as variáveis resposta foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA versão 10.0, considerando como variável resposta a produtividade mássica e o teor lipídico, ao final de cada etapa de tratamento. Os resultados foram expressos em Tabelas de estimativas de efeitos, e ainda em Tabelas de análise de variância (ANOVA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento celular

Os cultivos previstos na matriz experimental de Taguchi foram realizados em duplicatas e o crescimento celular acompanhado diariamente por leituras de absorbância e posterior correlação com a concentração celular. Todos os cultivos iniciaram com concentração celular de aproximadamente 150 mg L^{-1} e foram conduzidos em regime descontínuo até que fosse notada uma interrupção no crescimento, configurando o término da fase 1, e imediato início da fase 2 (suplementação de nutrientes com privação parcial da fonte de nitrato). Os cultivos foram encerrados ao se verificar o estado estacionário ou declínio da concentração celular. A Tabela 5.1 apresenta o valor médio de concentração celular em função do tempo para cada condição experimental realizada.

A fase 1 dos experimentos 5 e 6 apresentaram nove dias de duração, seguidos pelos experimentos 1, 4 e 7, com sete dias, experimentos 2 e 3 com seis dias, experimento 9 com cinco dias e por fim o experimento 8 que apresentou quatro dias de duração. A Fase 2 do experimento 3 foi a mais longa (seis dias), seguida pelos experimentos 7 e 9, com cinco dias, experimentos 1, 2 e 4, com quatro dias e experimentos 5, 6 e 8, com três dias de duração.

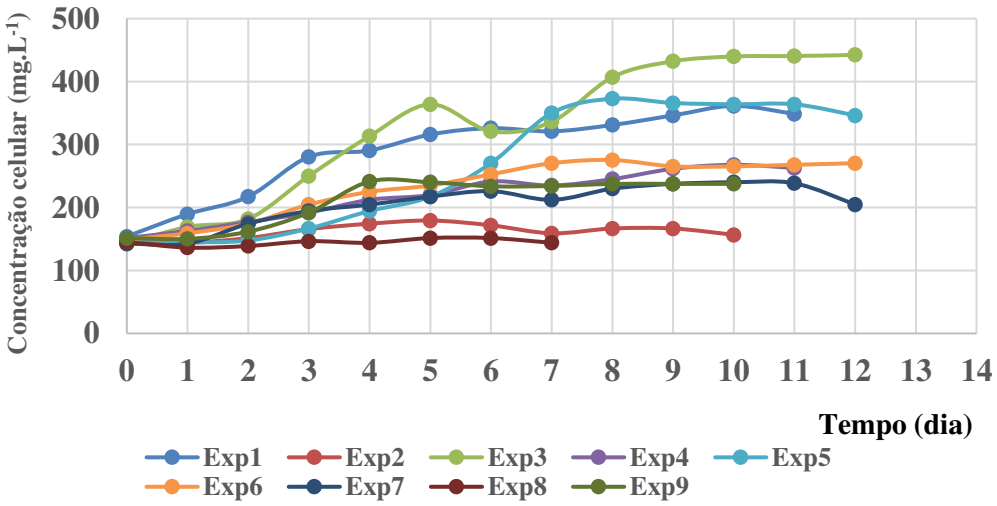
Tabela 5.1 – Concentração de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, referente a cada condição experimental do planejamento de Taguchi.

Tempo (dia)	Exp1 (mg/L)	Exp2 (mg/L)	Exp3 (mg/L)	Exp4 (mg/L)	Exp5 (mg/L)	Exp6 (mg/L)	Exp7 (mg/L)	Exp8 (mg/L)	Exp9 (mg/L)
0	154	145	143	151	151	149	143	145	151
1	189	144	169	163	145	159	143	136	150
2	217	151	182	177	148	174	174	139	162
3	280	166	250	192	167	205	194	154	192
4	291	174	313	212	194	225	205	144*	241
5	316	179	364	220	217	235	217	151	240*
6	326	172*	321*	241	270	253	232	151	234
7	321*	159	336	235*	350	270	212*	144	234
8	331	167	407	245	373	275	230		237
9	346	167	432	262	366*	265*	237		237
10	361	157	440	268	364	265	240		237
11	348		441	263	364	268	238		
12			442		346	270	205		

Fonte: Autoria própria.
Nota: *fim da fase1 e início da fase 2

Dentre os cultivos realizados observou-se que nos experimentos 3 e 5 obtiveram-se as maiores concentrações de biomassa, enquanto que no experimento 7 houve pouco crescimento e no experimento 8 não houve crescimento da microalga. O gráfico apresentado pela Figura 5.1 evidencia a discrepância no desenvolvimento da microalga nos diversos cultivos realizados.

Figura 5.1 – Concentração celular em função do tempo, durante as duas fases do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto para cada condição experimental do planejamento de Taguchi.



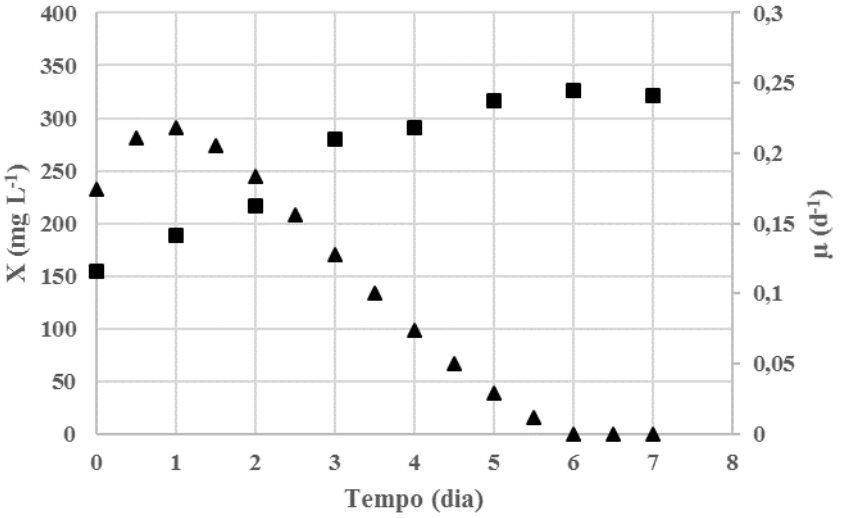
Fonte: Autoria própria.

As diferenças observadas entre os dias de duração de cada fase, bem como as concentrações de biomassa obtidas em cada condição experimental realizada, permitem intuir que os fatores manipulados nos ensaios afetaram de maneiras distintas os perfis de crescimento celular da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.

5.1.1 Avaliação do crescimento durante a Fase 1

Na condição experimental 1, conduzida sob iluminação azul, fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro, 0,3 vvm e 5,1 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, não observou-se a fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,22 d $^{-1}$, levando à máxima concentração de biomassa de 326 mg L $^{-1}$ no sexto dia, resultando uma produtividade de biomassa de 29 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.2 apresenta os perfis de desenvolvimento do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo do cultivo, referente ao experimento 1.

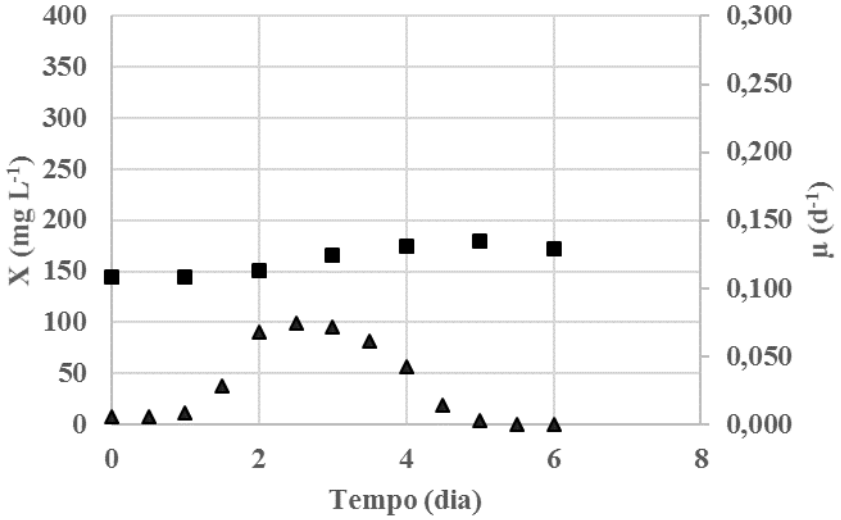
Figura 5.2 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 1.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 2, conduzida sob iluminação azul, fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro, 0,4 vvm e 6,6 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, observou-se um dia de fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,05 d $^{-1}$, levando a máxima concentração de biomassa de 179,2 mg L $^{-1}$ no quinto dia, resultando uma produtividade de biomassa de 5 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.3 apresenta os perfis de desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo referente ao experimento 2.

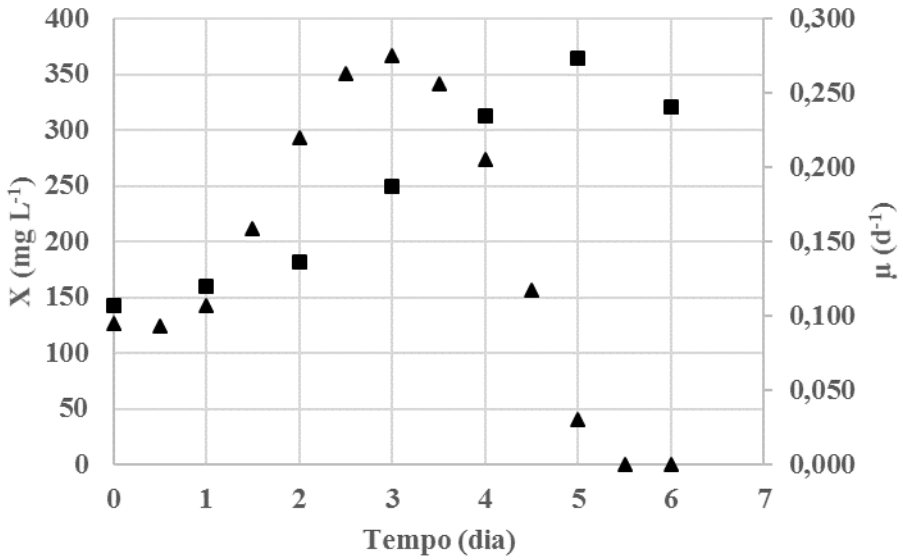
Figura 5.3 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 2.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 3, conduzida sob iluminação azul, fotoperíodo de 24 h claro / 0 h escuro, 0,5 vvm e 9 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, observou-se um dia de fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máximo foi de 0,27 d $^{-1}$ levando a máxima concentração de biomassa de 364 mg L $^{-1}$ no quinto dia, resultando uma produtividade de biomassa de 44 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.4 apresenta os perfis desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo referente ao experimento 3.

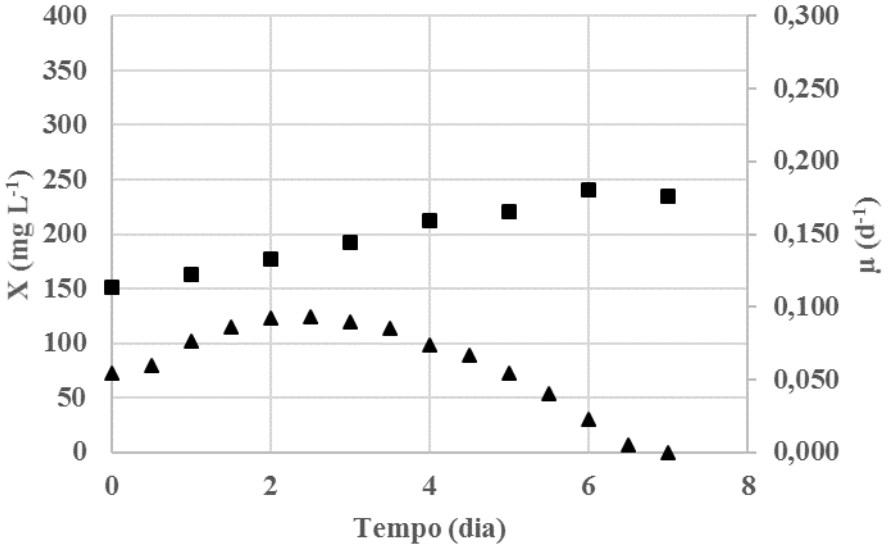
Figura 5.4 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 3.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 4, conduzida sob iluminação branca, fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro, 0,4 vvm e 9 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, não observou-se a fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máximo foi de 0,08 d $^{-1}$ levando a máxima concentração de biomassa de 241 mg L $^{-1}$ no quinto dia, resultando numa produtividade de biomassa de 15 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.5 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo referente ao experimento 4.

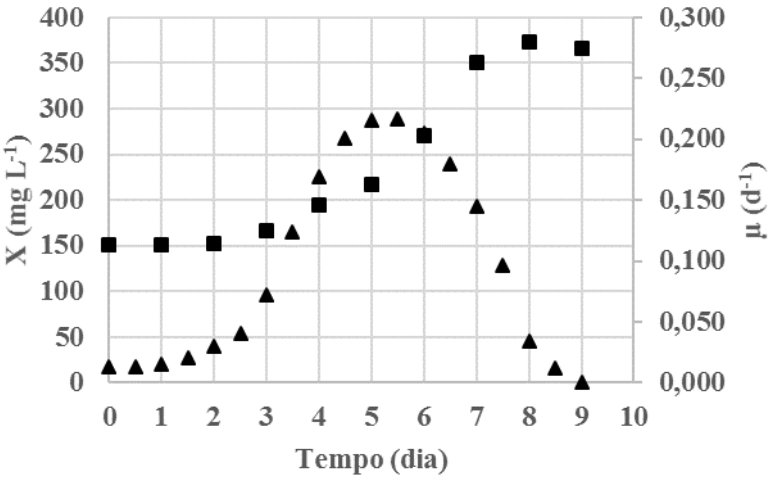
Figura 5.5 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 4.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 5, conduzida sob iluminação branca, fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro, 0,5 vvm e 5,1 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, observou-se três dias de fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máximo foi de 0,12 d $^{-1}$ levando a máxima concentração de biomassa de 373 mg L $^{-1}$ no oitavo dia, resultando numa produtividade de biomassa de 28 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.6 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo referente ao experimento 5.

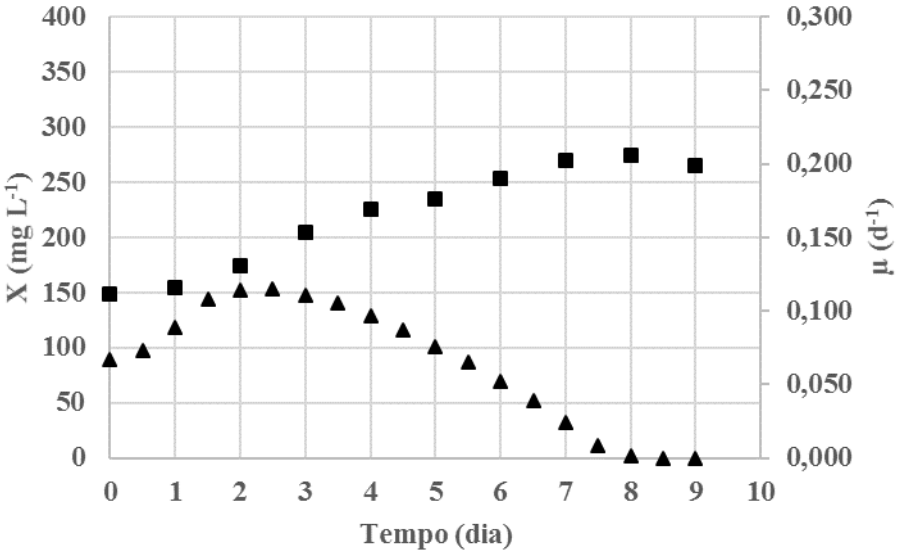
Figura 5.6 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 5.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 6, conduzida sob iluminação branca, fotoperíodo de 24 h claro / 24 h escuro, 0,3 vvm e 6,6 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, não observou-se a fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máximo foi de 0,1 d $^{-1}$ levando a máxima concentração de biomassa de 275 mg L $^{-1}$ no oitavo dia, resultando numa produtividade de biomassa de 17 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.7 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo na fase 1 referente ao experimento 6.

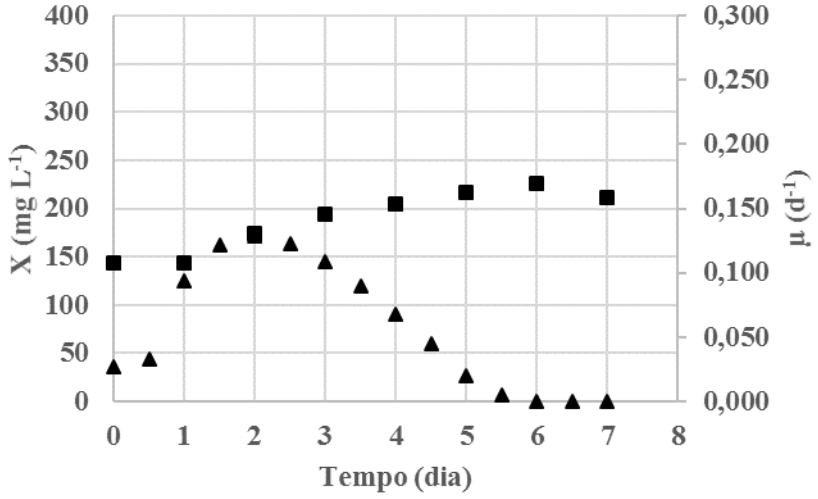
Figura 5.7 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 6.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 7, conduzida sob iluminação vermelha, fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro, 0,5 vvm e 6,6 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, não observou-se a fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máximo foi de 0,1 d $^{-1}$ levando a máxima concentração de biomassa de 232 mg L $^{-1}$ no sexto dia, resultando uma produtividade de biomassa de 15 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.8 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo durante a fase 1 referente ao experimento 7.

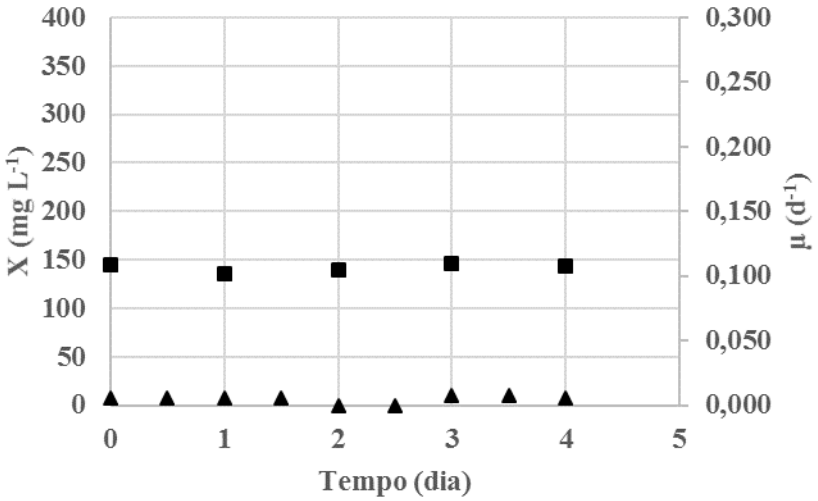
Figura 5.8 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 7.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 8, conduzida sob iluminação vermelha, fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro, 0,3 vvm e 9 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, observou-se que o cultivo não se desenvolveu bem, permanecendo praticamente inalterado (sem crescimento celular) e por consequência a velocidade específica de crescimento máximo foi nula, resultando uma concentração de biomassa de 154 mg L $^{-1}$ no terceiro dia, com produtividade de biomassa de 2 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.9 apresenta o crescimento celular e a velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo referente ao experimento 8.

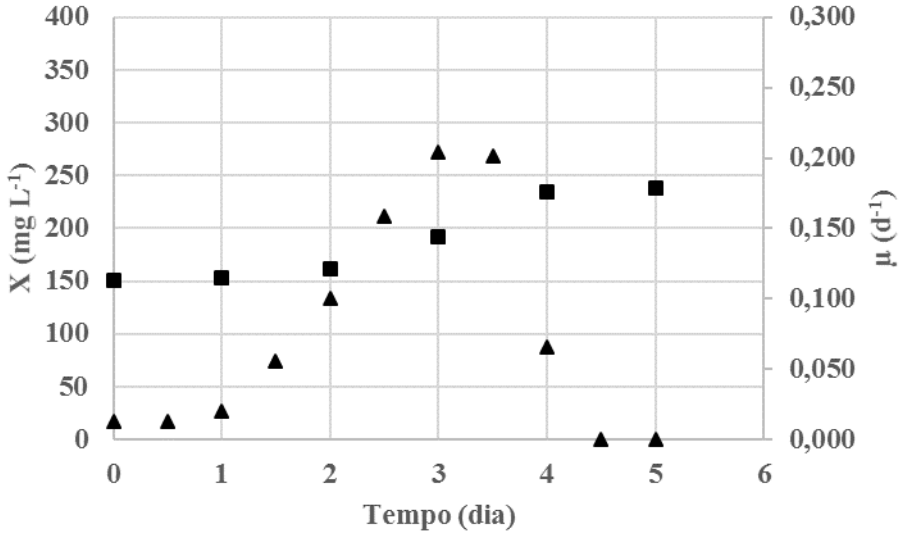
Figura 5.9 – Concentração celular X (- ■ -) e velocidade específica de crescimento μ (- ▲ -) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 8.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 9, conduzida sob iluminação vermelha, fotoperíodo de 24 h claro / 24 h escuro, 0,4 vvm e 5,1 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo, observou-se dois dias de fase Lag, enquanto que a velocidade específica de crescimento máximo foi de 0,11 d $^{-1}$ levando a máxima concentração de biomassa de 240 mg L $^{-1}$ no quarto dia, resultando uma produtividade de biomassa de 22 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$. A Figura 5.10 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e da velocidade específica de crescimento ao longo dos dias de cultivo na fase 1 referente ao experimento 9.

Figura 5.10 – Concentração celular X (■) e velocidade específica de crescimento μ (▲) durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento 9.



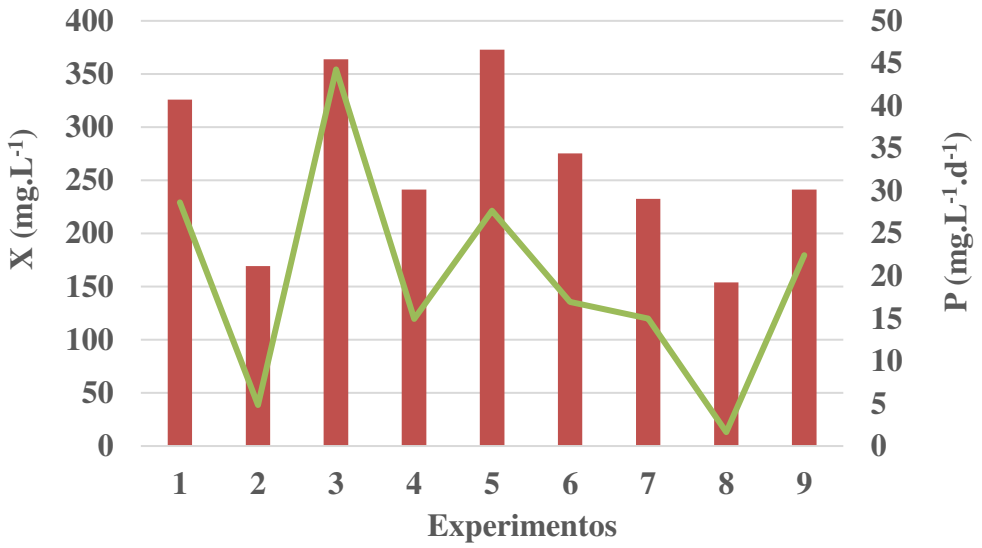
Fonte: Autoria própria.

Verifica-se que os experimentos 5 e 3, nos quais se atingiram as maiores concentrações de biomassa, 373 mg L $^{-1}$ e 364 mg L $^{-1}$, respectivamente, apresentaram somente um fator com níveis idênticos (aeração de 0,5 vvm) enquanto que os experimentos 8 e 2, que forneceram as menores concentrações de biomassa, 154 mg L $^{-1}$ e 179 mg L $^{-1}$, respectivamente, apresentaram o fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro como único fator de nível coincidente.

Com relação à produtividade volumétrica de biomassa, que leva em consideração a formação diária de biomassa por unidade de volume, no experimento 3 obteve-se o melhor resultado, seguido pelos experimentos 1 e 5, que alcançaram 44, 29 e 28 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$, respectivamente, enquanto que os experimentos 8 e 2 demonstraram o pior desempenho, com 2 e 5 mg L $^{-1}$ d $^{-1}$, respectivamente. A Figura 5.11 apresenta um gráfico com a

distribuição das concentrações celulares e produtividades volumétricas de biomassa para cada experimento realizado, durante a fase 1.

Figura 5.11 - Concentração máxima de biomassa X ( ) e produtividade volumétrica P ( ) de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, para cada condição experimental do planejamento de Taguchi, durante a fase 1.



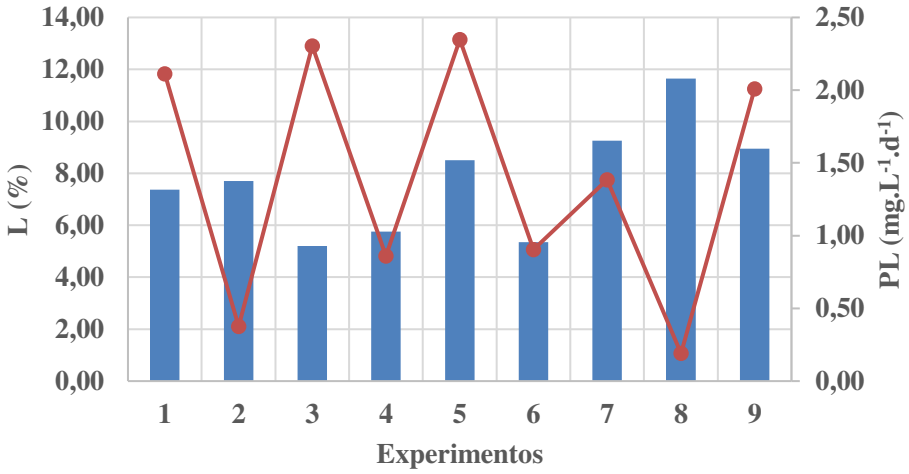
Fonte: Autoria própria.

A partir da quantificação do teor lipídico da fase 1 verificou-se que os cultivos iluminados com a luz de cor vermelha proporcionaram os maiores acúmulos de lipídeos, 11,7 %, 9,3 % e 8,9 % para os experimentos 8, 7 e 9, respectivamente, seguido pelos experimentos 5 (iluminação branca) com 8,5% , experimentos 2 e 1 com 7,7 e 7,4% de lipídeos, respectivamente, e ambos iluminados pela cor azul, na sequência o experimento 4, 6 e 3, com 5,7 %, 5,4 % e 5,2 % de lipídeos. Além da iluminação vermelha nos cultivos durante a fase 1, notou-se que os experimentos com 1 h claro / 1 h escuro de fotoperíodo também se destacaram no acúmulo de lipídeos (experimentos 5 e 2).

Em termos de produtividade lipídica, que se relaciona diretamente com a produtividade volumétrica de biomassa, os experimentos 5 e 3 apresentaram os melhores resultados, com aproximadamente os mesmos valores, 2,35 e 2,30 mg L^{-1} d^{-1} de lipídeos, respectivamente, seguido de perto pelos experimentos 1 e 9, com 2,11 e 2,01 mg L^{-1} d^{-1} de lipídeos, respectivamente. Na sequência vêm os experimentos 7, 6, 4, 2 e 8 com 1,38 mg L^{-1} d^{-1}, 0,90 mg L^{-1} d^{-1}, 0,86 mg L^{-1} d^{-1}, 0,38 mg L^{-1} d^{-1} e 0,19 mg L^{-1} d^{-1}, respectivamente.

A Figura 5.12 apresenta um gráfico com a distribuição dos teores de lipídios e da produtividade lipídica para cada condição experimental realizada durante a fase 1.

Figura 5.12 - Teor de lipídeos L ( ) e produtividade lipídica PL ( ) de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, para cada condição experimental do planejamento de Taguchi, durante a fase 1.



Fonte: Autoria própria.

Com base nos resultados obtidos com os experimentos realizados e considerando-se apenas a fase 1, observa-se que os cultivos realizados sob iluminação azul foram os que apresentaram maiores velocidades específicas de crescimento, enquanto que os cultivos iluminados sob iluminação branca alcançaram maiores valores de concentração de biomassa, embora num período mais longo de cultivo. Já os cultivos sob iluminação vermelha ficaram caracterizados por fornecerem as menores concentrações de biomassa mas, por outro lado, foram os que resultaram os maiores teores de lipídeos durante a fase 1 do cultivo.

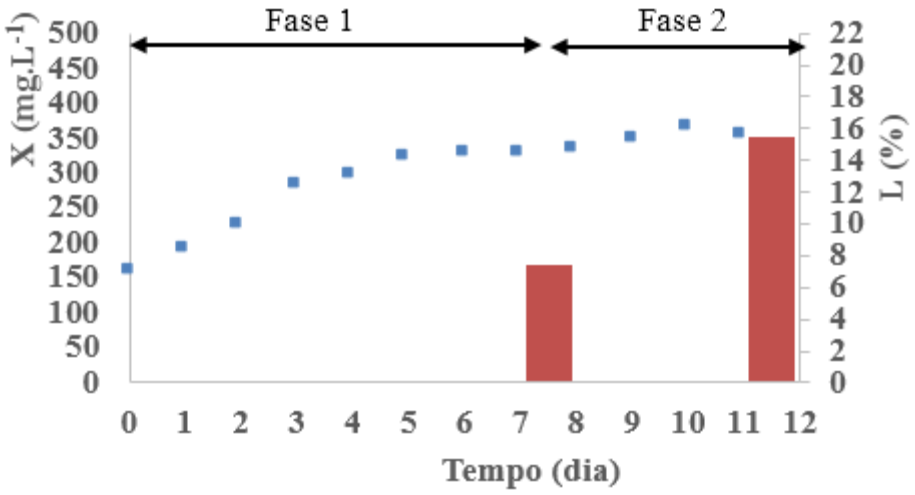
5.1.2 Avaliação do crescimento celular durante a Fase 2

Ao término da fase 1, iniciou-se imediatamente a fase 2, caracterizada pela submissão dos cultivos de cada condição experimental a períodos de privação parcial da fonte de nitrato, configurando uma forma de "stress" para as células microalgais, induzindo-as a um maior acúmulo de lipídeos em relação a fase 1. O fim da fase 2 marcou o encerramento do cultivo em cada condição experimental.

Na condição experimental 1 (iluminação azul, fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro, 0,3 vvm e 5, L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) observou-se um aumento de 12,6 % na concentração máxima de biomassa em relação a fase 1, atingindo 361,42 mg L $^{-1}$, em 3 dias de cultivo na segunda fase, enquanto que o teor de lipídeos se

elevou 2,1 vezes, alcançando 15,46 %. A Figura 5.13 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos para as fases 1 e 2, durante o experimento 1.

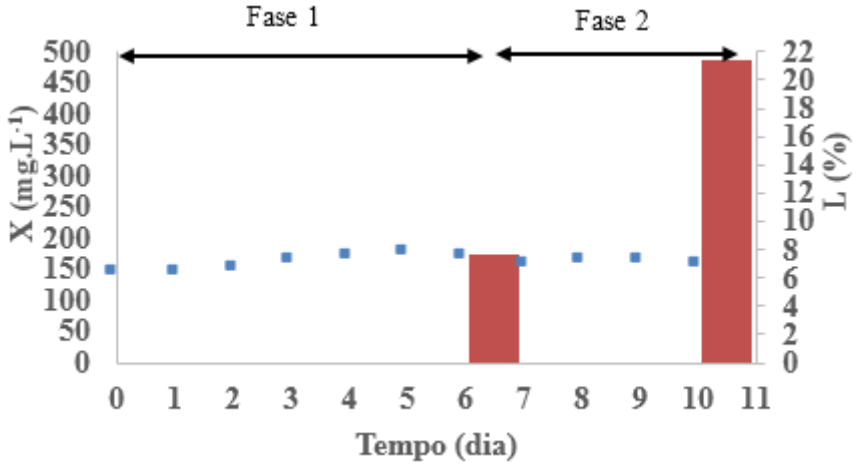
Figura 5.13 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 1.



Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 2 (iluminação azul, fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro, 0,4 vvm e 6,6 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) foi observado uma queda de 7 % na concentração máxima de biomassa, resultando 166,7 mg L $^{-1}$ em três dias de cultivo na fase 2. Entretanto, o teor de lipídeos aumentou em 2,77 vezes em relação a primeira fase do cultivo, atingindo 21,4%, como mostrado na Figura 5.14.

Figura 5.14 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 2.

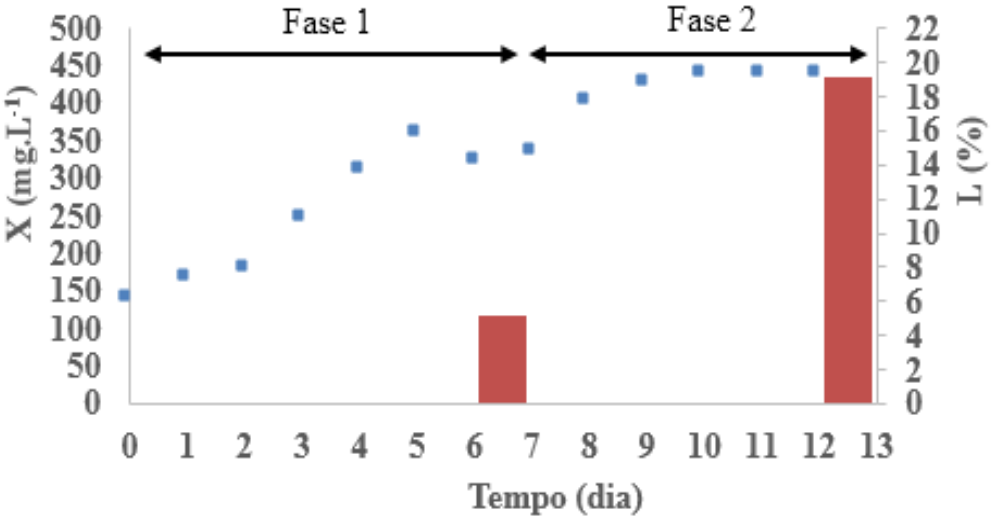


Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 3 (iluminação azul, fotoperíodo de 24 h claro / 0 h escuro, 0,5 vvm e 9 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) observou-se um aumento de 21,54 % na concentração máxima de biomassa, atingindo 442,36 mg L $^{-1}$, e o teor de lipídeos foi aumentado em 3,7 vezes, alcançando 19,22 %.

A Figura 5.15 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos para as fases 1 e 2 durante o experimento 3.

Figura 5.15 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 3.



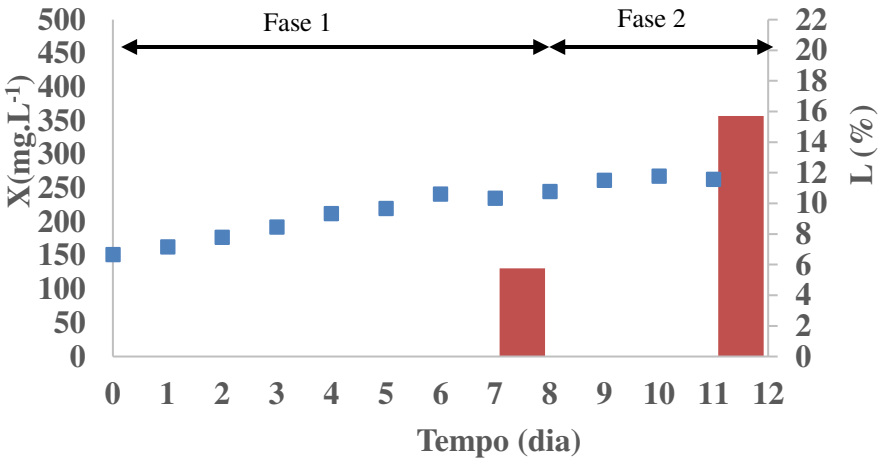
Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 4 (iluminação branca, fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro, 0,4 vvm e 9 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) observou-se um aumento de 11,0 % na concentração de biomassa após 3 dias de cultivo na fase 2, atingindo 267,84 mg L $^{-1}$. Nesse período, o teor de lipídeos foi aumentado 2,73 vezes em relação a fase 1, alcançando 15,7 %.

A Figura 5.16 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos entre a fase 1 e 2 durante o experimento 4.

Na condição experimental 5(iluminação branca, fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro, 0,5 vvm e 5,1 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) foi observado uma ligeira queda de 2,37 % na concentração de biomassa durante a fase 2, resultando em 363,95 mg L $^{-1}$, enquanto que o teor de lipídeos foi elevado em 1,94 vezes em relação a primeira fase, alcançando 16,15 %.

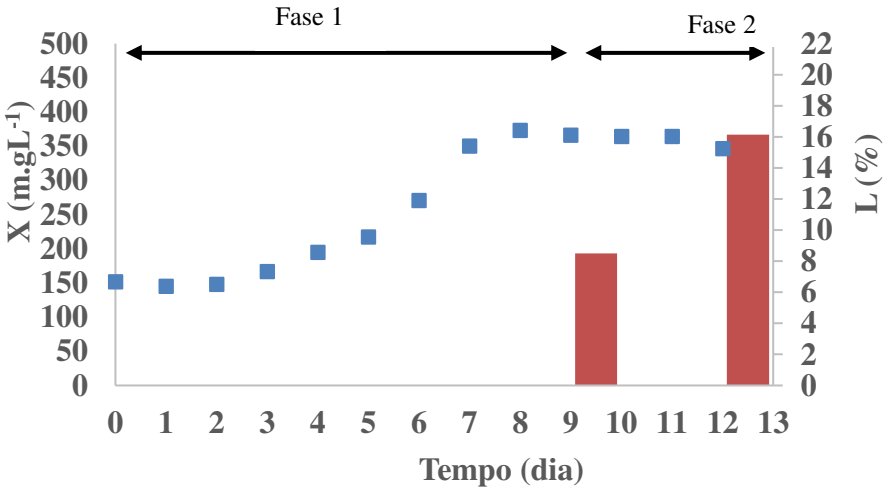
Figura 5.16 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 4.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.17 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos para as fases 1 e 2 durante o experimento 5.

Figura 5.17 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 5.



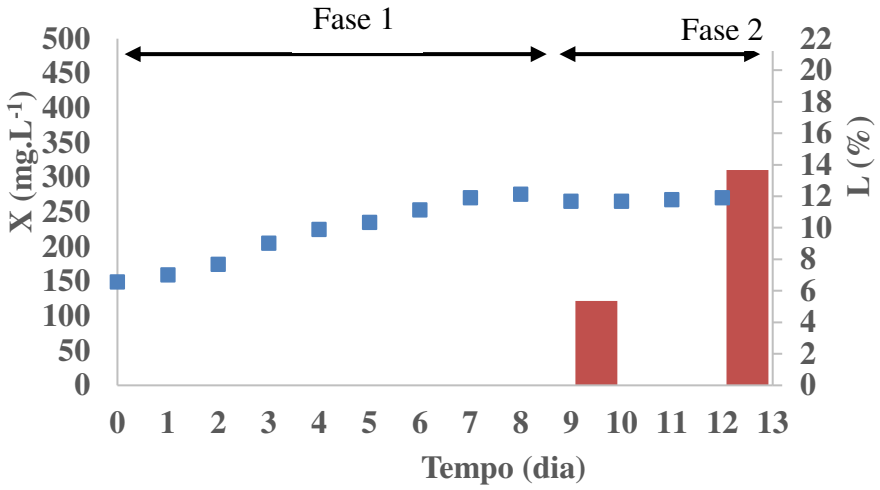
Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 6 (iluminação branca, fotoperíodo de 24 h claro / 24 h escuro, 0,3 vvm e 6,6 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) foi notado uma queda de 1,84 % na concentração de biomassa durante a fase 2 em relação a primeira fase, resultando

em 270 mg L $^{-1}$ de biomassa, enquanto que o teor de lipídeos aumentou 2,55 vezes em relação a fase 1, atingindo 13,67 %.

A Figura 5.18 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos entre a fase 1 e 2 durante o experimento 6.

Figura 5.18 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 6.



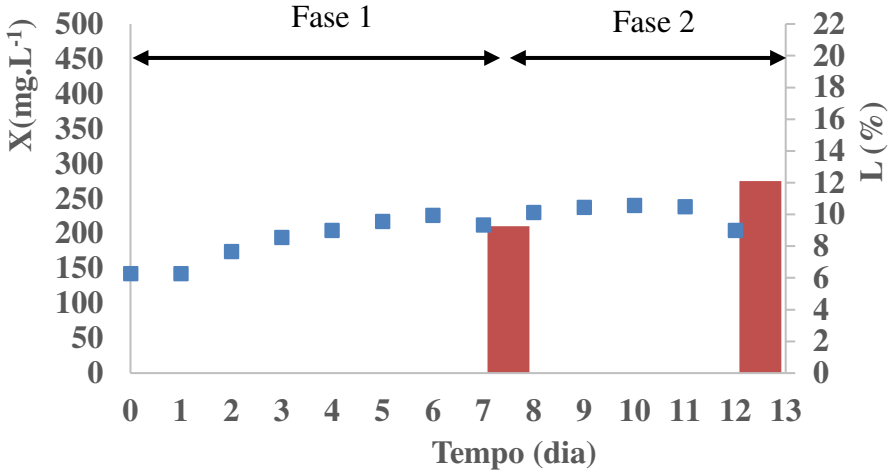
Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 7 (iluminação vermelha, fotoperíodo de 12 h claro / 12 h escuro, 0,5 vvm e 6,6 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) foi observado um aumento de 6,2 % na concentração de biomassa durante a fase 2 em relação a fase 1, atingindo 240 mg L $^{-1}$ de biomassa, enquanto que o teor de lipídeos aumentou 1,31 vezes e relação a primeira fase.

A Figura 5.19 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos para as fases 1 e 2 durante o experimento 7.

Na condição experimental 8 (iluminação vermelha, fotoperíodo de 1h claro / 1h escuro, 0,3 vvm e 9 L min $^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) observou-se um aumento de 3,4 % na concentração de biomassa em relação a primeira fase, atingindo 151,48 mg L $^{-1}$, enquanto que o teor de lipídeos aumentou 1,08 vezes, alcançando 12,66 % ao fim da fase 2.

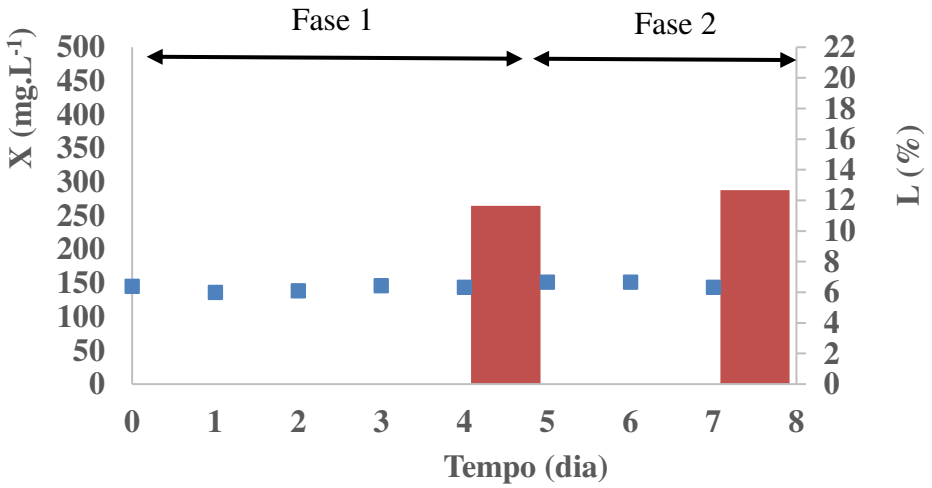
Figura 5.19 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 7.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.20 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos para as fases 1 e 2 durante o experimento 8.

Figura 5.20 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 8.

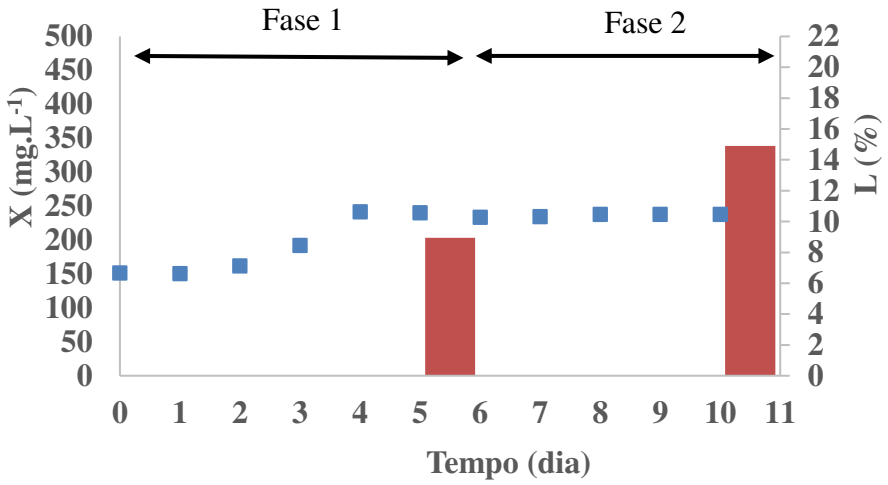


Fonte: Autoria própria.

Na condição experimental 9 (iluminação vermelha, fotoperíodo de 24 h claro / 24 h escuro, 0,4 vvm e 5,1 $Lmin^{-1}$ de vazão de recirculação de meio de cultivo) observou-se uma queda de 1,57 % na concentração de biomassa em relação a primeira fase, resultando em 237,48 mg L^{-1}, enquanto que o teor de lipídeos aumentou 1,66 vezes, alcançando 14,9 % ao fim da fase 2.

A Figura 5.21 apresenta os desenvolvimentos do crescimento celular e do teor de lipídeos entre a fase 1 e 2 durante o experimento 9.

Figura 5.21 - Concentração de biomassa (X) em função do tempo (■) durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* e teor de lipídeos (L) na biomassa (■) ao final de cada fase do cultivo, na condição experimental 9.



Fonte: Autoria própria.

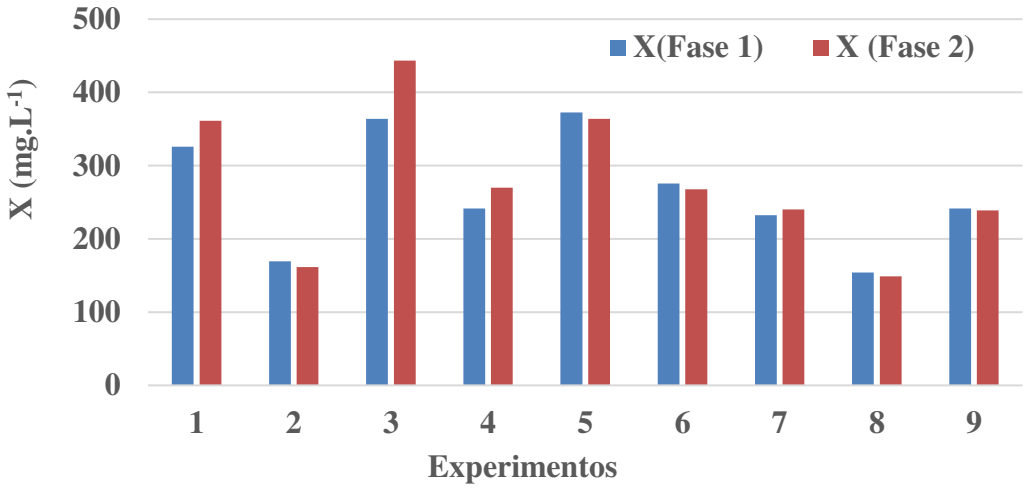
A partir dos cultivos realizados (experimentos) foi possível verificar que a estratégia de submeter os cultivos a uma etapa de estresse nutricional (privação parcial da fonte de nitrato), configurada como a fase 2 neste trabalho, afetou ligeiramente a obtenção da biomassa e fortemente o acúmulo de lipídeos.

As concentrações de biomassa sofreram elevações ou declínios discretos entre as fases 1 e 2. Por consequência, as produtividades diminuíram, devido ao prolongamento do período de cultivo com a fase 2 sem a correspondente elevação da concentração de biomassa. Entretanto os teores de lipídeos apresentaram elevações em todos os experimentos entre a fase 1 e a fase 2.

A Figura 5.22 apresenta a distribuição das concentrações de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* obtido em cada experimento de acordo com o planejamento de Taguchi, entre as fases 1 e 2, utilizando o fotobiorreator integrado proposto neste trabalho.

A Figura 5.23 ilustra a variação do teor de lipídeos entre as fases 1 e 2, para cada experimento conduzido de acordo com o planejamento de Taguchi, utilizando o fotobiorreator integrado proposto.

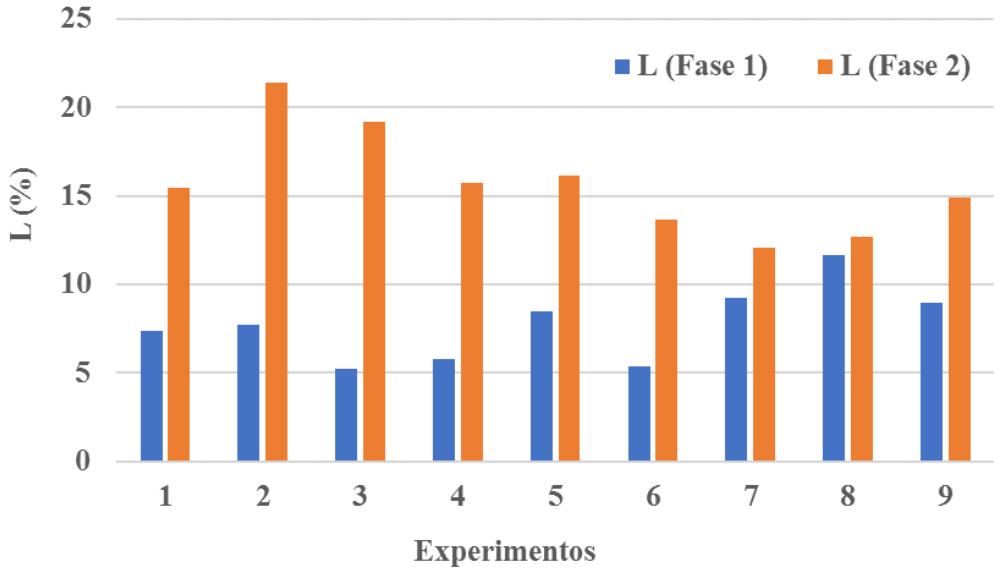
Figura 5.22 - Concentrações de biomassa (X) obtidas ao final de cada fase do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* ao final de cada fase do experimento realizado, de acordo com o planejamento de Taguchi.



Fonte: Autoria própria.

Embora os cultivos tenham respondido de forma semelhante quanto à variação da concentração de biomassa (elevações e decréscimos discretos) pode-se notar que o experimento 3 se destacou novamente com a maior elevação, seguido pelos experimentos 1 e 4. Em contrapartida, as variações nos teores de lipídeos foram mais expressivas entre uma fase e outra.

Figura 5.23 - Teores de lipídeos na biomassa (L) obtidos ao final de cada fase do cultivo de *Chlorella minutissima* para cada experimento realizado, de acordo com o planejamento de Taguchi.



Fonte: Autoria própria.

Com base nos resultados obtidos ao fim da fase 2, que culminou com o encerramento dos cultivos, pode-se considerar que a estratégia de submeter os cultivos à etapa de privação parcial da fonte de nitrato, para induzir o acúmulo de lipídeos, foi adequada, uma vez que em todos os cultivos realizados de acordo com o planejamento experimental verificou-se elevação nos teores lipídicos, corroborando com ZHU et al. (2016), que relatou elevação no teor de lipídeos da microalga *Scenedesmus obliquus* de 10 para 29,5% com a submissão do cultivo a privação nutricional.

5.2 Análise estatística

Os resultados obtidos com a execução dos experimentos previstos no planejamento foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 para verificar os efeitos e significância dos fatores (Cor da iluminação; Fotoperíodo; Aeração; Vazão de recirculação de meio) sobre as variáveis respostas (X = concentração de biomassa; P = produtividade; L = teor de lipídeos; PL = produtividade lipídica) nas fases 1 e 2 do cultivo, bem como as variações ocorridas por estas em porcentagens entre uma fase e outra.

5.2.1 Resultados obtidos durante a Fase 1

5.2.1.1 Concentração de biomassa

Os valores de concentração máxima de biomassa alcançados ao final da fase 1 de cada cultivo seguem apresentados na Tabela 5.15 para análise estatística da influência dos fatores sobre esta variável resposta. A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciaram a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 2 (branca), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24h claro / 0h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelha), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 $L.min^{-1}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

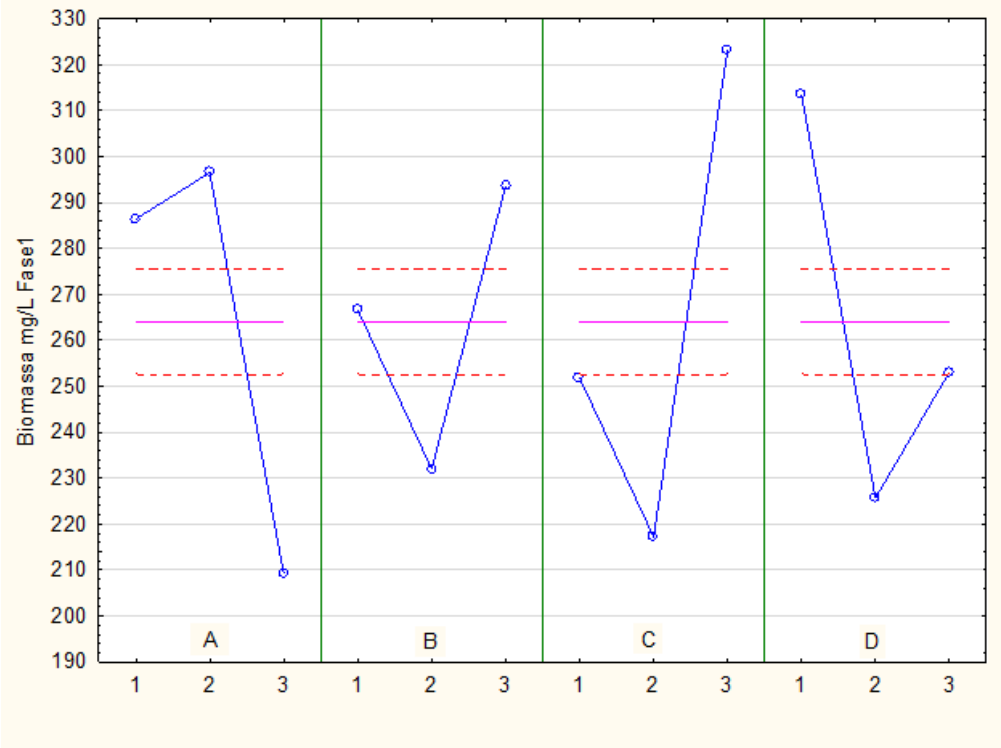
Tabela 5.2 - Concentração máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 1, empregando o fotobiorreator integrado proposto.

	Fatores				Biomassa ($mg.L^{-1}$)		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	331	321	**326**
2	1	2	2	2	154	184	**169**
3	1	3	3	3	356	372	**364**
4	2	1	2	3	237	245	**241**
5	2	2	3	1	366	379	**373**
6	2	3	1	2	270	280	**275**
7	3	1	3	2	235	230	**232**
8	3	2	1	3	149	159	**154**
9	3	3	2	1	237	245	**241**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa, foram avaliados graficamente conforme ilustrado na Figura 5.24.

Figura 5.24 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA), que classifica como significativo todo fator que apresentar o p-valor menor do que 0,05. Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentaram significância sobre a concentração de biomassa, conforme apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	27336,05	2	13668,03	139,8436	0,000000
B	11421,48	2	5710,74	58,4291	0,000007
C	34931,89	2	17465,95	178,7018	0,000000
D	24145,89	2	12072,94	123,5236	0,000000
Residual	879,64	9	97,74		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância

Com base na análise gráfica (Figura 5.24) e análise de variância (Tabela 5.3) da influência dos fatores sobre a concentração de biomassa durante a fase um, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo durante a fase 1: fator A (iluminação) ajustado no nível 2 (branca), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$). Tal ajuste dos fatores experimentais em estudo deve resultar os mais elevados valores de concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* empregando o fotobiorreator integrado proposto.

A influência positiva da cor da iluminação branca (nível 2) para aumentar a concentração de biomassa da microalga *Chlorella minutissima*, cultivada no fotobiorreator integrado, foi discretamente maior do que a influência da cor azul (nível 1), sugerindo uma pequena diferença, aproximadamente 10 $mg.L^{-1}$, na concentração da biomassa.

A cor de iluminação branca reúne todas as frequências do espectro luminoso, fornecendo um leque de níveis de energia para o micro-organismo realizar diversas funções metabólicas de manutenção e de reprodução, que se traduz na elevação da concentração de biomassa formada, em um cultivo fotoautotrófico. De acordo com Hultberg et al. (2014), a

cor de iluminação branca no cultivo da microalga *Chlorella minutissima* proporcionou a maior concentração de biomassa atingida em comparação com outras cores.

Em contrapartida, a cor de iluminação vermelha (nível 3), utilizada no cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado, foi indicada pela análise estatística, como prejudicial para a concentração de biomassa, tendendo a minimizá-la, o que é um resultado indesejado para o objetivo do processo. Tal influência pode ser explicada pelo fato de que a cor vermelha apresenta faixas elevadas de comprimento de onda e, por consequência, baixo nível energético a ser fornecido para o micro-organismo, dificultando o crescimento celular (YAM; HASSAN, 2005).

A análise estatística também sugeriu que o fator fotoperíodo, quando ajustado no nível 3 (24h claro: 0h escuro), ou seja, completamente iluminado, favoreceu a formação de biomassa da microalga *Chlorella minutissima*, enquanto que o fotoperíodo alternado (nível 2), com 1 h claro : 1 h escuro, prejudicou a formação de biomassa. A proposta de ajuste deste fator corrobora com os relatos de Jacob-Lopes et al. (2009), que indicaram as maiores concentrações de biomassa microalgal quando cultivada sob 24 h diárias de iluminação em comparação à diferentes fotoperíodos testados.

De acordo com Brindley et al. (2016), o fotoperíodo tem importância nos processos fotossintéticos porque ele possibilita regular o tempo que o micro-organismo dispõem para converter a energia luminosa recebida em energia química, que é posteriormente utilizada para a sua morfologia, metabolismo e crescimento celular. Cabe destacar que o tempo de geração das microalgas é de aproximadamente 3 dias, sugerindo ser este um dos principais motivos para que fotoperíodos alternados, como o que foi implementado pelo nível 2 (1 h claro: 1 h escuro), não forneçam condições adequadas para o crescimento celular das microalgas.

Considerando cultivos fotoautotróficos, a única fonte de carbono para a realização da fotossíntese pelo micro-organismo, provêm do CO_2 disponível na aeração, levando a alguns autores suplementar os cultivos microalgais com injeção de CO_2 puro para elevar a concentração de biomassa obtida (AMARAL et al., 2015). No cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto, o CO_2 é disponibilizado apenas pelo fornecimento de ar pela aeração empregada, que foi o fator que, segundo a análise estatística, deve ser ajustado no nível 3, máximo (0,5 vvm), para elevar a concentração da biomassa formada.

A vazão de recirculação de meio de cultivo proporciona às microalgas a oportunidade de, ao atravessar a configuração tubular que tem o menor raio de distribuição

do cultivo, em comparação à configuração coluna de bolhas, ter maior aproximação com a fonte luminosa, que se localiza internamente por todo o fotobiorreator. Assim, em menores vazões aumenta-se o tempo de exposição à luz na configuração tubular, recebendo mais energia luminosa comparado às vazões mais elevadas, resultando melhor condição de iluminação para o crescimento celular.

5.2.1.2 Produtividade volumétrica de biomassa

Os valores de produtividade volumétrica máxima de biomassa alcançados durante a fase 1 de cada cultivo experimental seguem apresentados na Tabela 5.4 para análise estatística da influência dos fatores sobre essa variável resposta.

Tabela 5.4 - Produtividade volumétrica de biomassa máxima de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi ao final da fase 1, empregando o fotobiorreator integrado proposto.

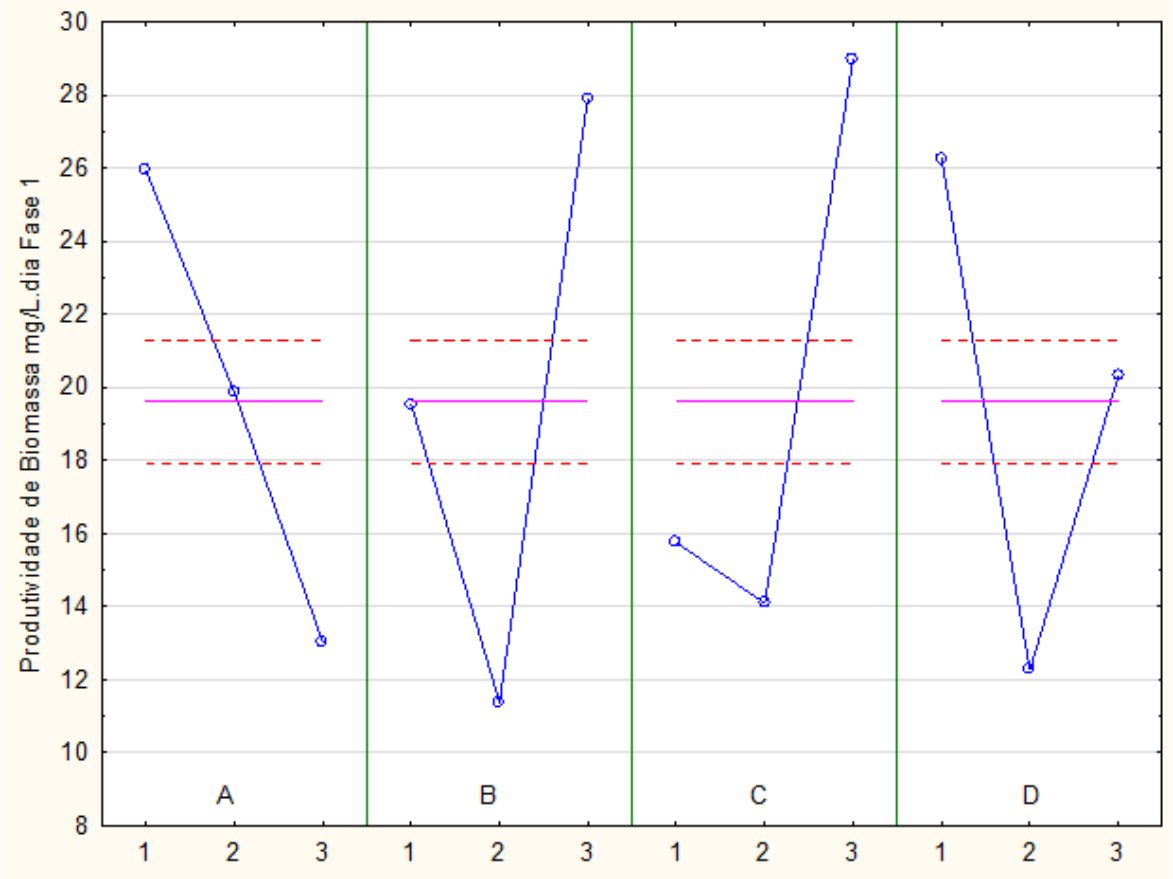
	Fatores				**Produtividade Volumétrica de Biomassa mg.L^{-1}.d^{-1}**		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	30	28	**29**
2	1	2	2	2	3	7	**5**
3	1	3	3	3	43	45	**44**
4	2	1	2	3	15	15	**15**
5	2	2	3	1	27	29	**28**
6	2	3	1	2	18	16	**17**
7	3	1	3	2	16	14	**15**
8	3	2	1	3	2	2	**2**
9	3	3	2	1	22	23	**22**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a produtividade volumétrica de biomassa foram avaliados graficamente conforme ilustrado na Figura 5.25. A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 L.min $^{-1}$) a variável

resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelha), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 $L.min^{-1}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Figura 5.25 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a produtividade volumétrica de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentam significância sobre a produtividade volumétrica de biomassa conforme apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5.- Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade volumétrica de biomassa durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	500,5447	2	250,2723	119,1495	0,000000
B	817,7397	2	408,8698	194,6544	0,000000
C	799,7661	2	399,8830	190,3760	0,000000
D	592,8426	2	296,4213	141,1200	0,000000
Residual	18,9044	9	2,1005		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância

Com base na análise gráfica (Figura 5.25) e análise de variância (Tabela 5.5) da influência dos fatores sobre a produtividade volumétrica de biomassa durante a fase 1, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo durante a fase 1: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24h claro / 0h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 3 (0,5vvm) e fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$). Tal ajuste dos fatores experimentais em estudo deve resultar os mais elevados valores de produtividade volumétrica de biomassa de *Chlorella minutissima* empregando o fotobiorreator integrado proposto.

Cabe destacar que, com exceção do fator cor da iluminação, o ajuste das condições experimentais que resultam maior concentração de biomassa também resultam maior produtividade volumétrica de biomassa da microalga *Chlorella minutissima* em estudo, sendo a cor azul mais favorável para elevar a produtividade em biomassa microalgal cultivada no fotobiorreator integrado proposto. Tal fato corrobora com o que foi relatado por Park et al. (2012), que sugeriu utilizar a iluminação de cor azul para o cultivo de *M. aeruginosa* para se alcançar os maiores valores de produtividade de biomassa.

5.2.1.3 Teor de lipídeos

Os valores de teor de lipídeos alcançado ao final da fase 1 de cada cultivo experimental estão apresentados na Tabela 5.6 para análise estatística da influência dos fatores sobre essa variável resposta.

Tabela 5.6 - Teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima* alcançado em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 1, empregando-se o fotobiorreator integrado proposto.

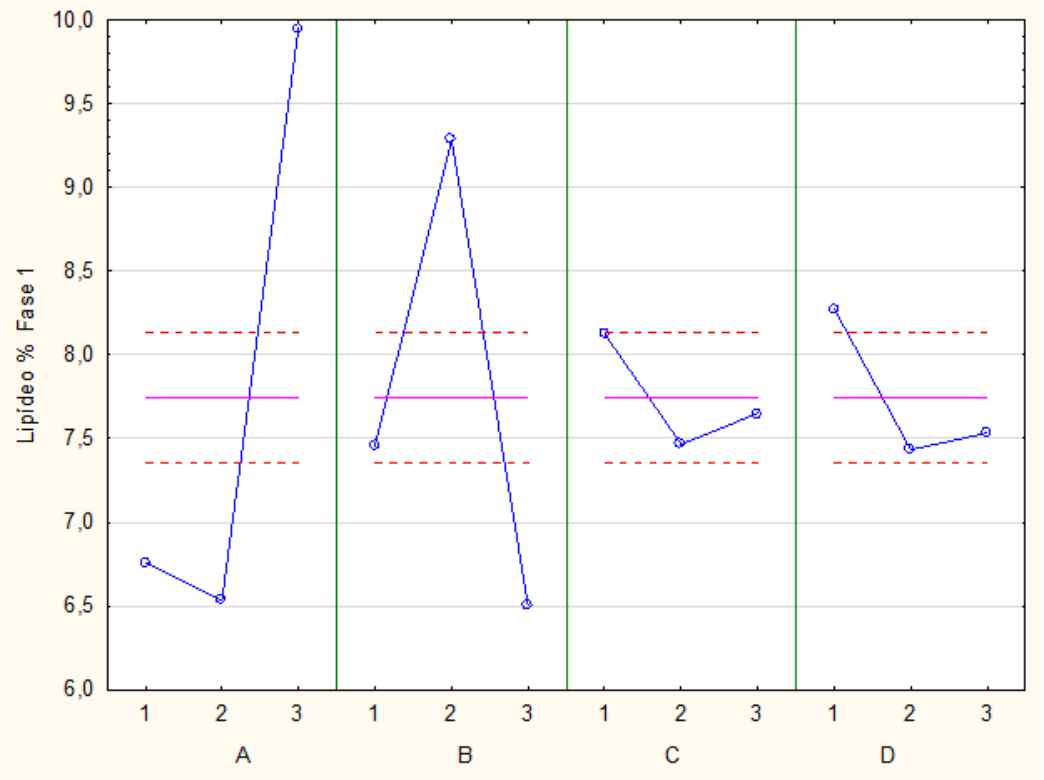
	Fatores				Lipídeos (%)		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	7,25	7,5	**7,4**
2	1	2	2	2	7,5	7,9	**7,7**
3	1	3	3	3	5	5,4	**5,2**
4	2	1	2	3	6	5,5	**5,75**
5	2	2	3	1	8,8	8,2	**8,5**
6	2	3	1	2	5,2	5,5	**5,35**
7	3	1	3	2	9	9,5	**9,25**
8	3	2	1	3	12	11,3	**11,65**
9	3	3	2	1	8,7	9,2	**8,95**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre o teor de lipídeos foram avaliados graficamente conforme ilustrado na Figura 5.26. A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelho), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 1 (0,3 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 $L.min^{-1}$) sugere-se que a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Considerando que todos os experimentos foram submetidos à mesma depleção da fonte de nitrato durante os cultivos, destaca-se então neste caso, a grande diferença de influência dos fatores sobre a variável resposta, observando-se claramente que os fatores cor da iluminação e fotoperíodo são os principais responsáveis pelo acúmulo de lipídeos na biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado, enquanto que os fatores aeração e vazão de recirculação pouco interferem no acúmulo de lipídeos.

Figura 5.26- Gráfico dos efeitos dos fatores sobre o teor de lipídeos da biomassa microalgal durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentam significância sobre o teor de lipídeos conforme apresentado pela Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o teor de lipídeos da biomassa microalgal durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	43,82195	2	21,91097	190,3004	0,000000
B	23,99195	2	11,99597	104,1870	0,000001
C	1,38528	2	0,69264	6,0157	0,021938
D	2,53694	2	1,26847	11,0169	0,003809
Residual	1,03625	9	0,11514		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância

Com base na análise gráfica (Figura 5.26) e análise de variância (Tabela 5.7) da influência dos fatores sobre o teor lipídico na biomassa durante a fase 1, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo durante a fase 1: fator A (iluminação) ajustado no nível 3 (vermelho), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 1 (0,3 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 L min^{-1}), de modo a se obter o máximo valor de teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima*, quando cultivada no fotobiorreator integrado proposto.

Os fatores cor da iluminação e fotoperíodo foram os mais influentes para o acúmulo de lipídeos, sendo estes fatores responsáveis pelo fornecimento de energia luminosa para as células utilizarem tal energia para a síntese de metabólitos e se multiplicar. Como a energia fornecida pelos fótons da luz vermelha é 40 % menor do que a energia disponibilizada pela cor azul, por exemplo (YAM; HASSAN, 2005), aliado a um fotoperíodo alternado, induz as células do micro-organismo a estocarem essa energia em metabólitos de reserva, como os lipídeos, ao invés de usá-la para se multiplicarem. Isto está de acordo com observado nos ensaios da fase 1 desenvolvidos neste trabalho, em que a cor da iluminação vermelha e o fotoperíodo alternado (1 h claro: 1 h escuro) foram propostos para proporcionar os maiores acúmulos de lipídeos, em detrimento do crescimento da microalga *Chlorella minutissima*.

5.2.1.4 Produtividade lipídica

Os valores da produtividade lipídica alcançado ao final da fase 1 de cada cultivo experimental seguem apresentados na Tabela 5.8 para análise estatística da influência dos fatores sobre a produtividade lipídica da biomassa.

A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 L.min^{-1}) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelho), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 1 (0,3 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 L.min^{-1}), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

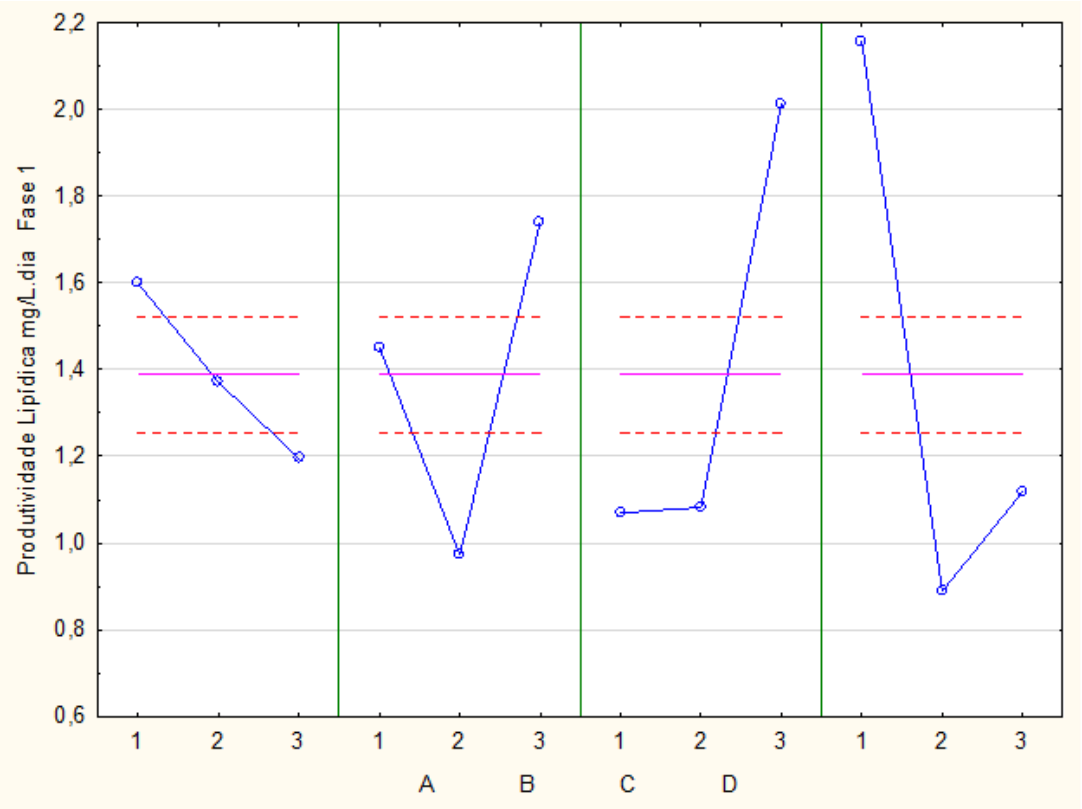
Tabela 5.8 - Produtividade lipídica máxima de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi na fase 1, empregando o fotobiorreator integrado.

	Fatores				Produtividade Lipídica mg.L-1.d^{-1}		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	2,14	2,09	**2,11**
2	1	2	2	2	0,20	0,56	**0,37**
3	1	3	3	3	2,17	2,44	**2,30**
4	2	1	2	3	0,88	0,83	**0,86**
5	2	2	3	1	2,34	2,36	**2,35**
6	2	3	1	2	0,94	0,87	**0,91**
7	3	1	3	2	1,41	1,36	**1,39**
8	3	2	1	3	0,19	0,19	**0,19**
9	3	3	2	1	1,92	2,09	**2,01**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa, foram avaliados graficamente conforme ilustrado na Figura 5.27.

Figura 5.27 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Notou-se graficamente que os fatores aeração e vazão de recirculação de meio foram os mais influentes para a variável resposta produtividade lipídica, diferente com o que foi observado para o acúmulo de lipídeos. Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentam significância sobre a produtividade lipídica conforme apresentado pela Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	0,490983	2	0,245491	18,1977	0,000688
B	1,805503	2	0,902752	66,9190	0,000004
C	3,510602	2	1,755301	130,1165	0,000000
D	5,480431	2	2,740216	203,1260	0,000000
Residual	0,121412	9	0,013490		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância

Com base na análise (Figura 5.27) e análise de variância (Tabela 5.9) da influência dos fatores sobre a produtividade lipídica da biomassa durante a fase 1, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo durante a fase 1: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1.L min $^{-1}$), de modo a se alcançar os valores mais elevados de produtividade em lipídeos empregando-se o fotobiorreator integrado proposto para o cultivo de *Chlorella minutissima*.

Sabendo que a produtividade lipídica leva em consideração a produtividade em biomassa com o teor de lipídeos, foi observado que houve propostas de ajustes conflitantes para os fatores cor de iluminação (A) e fotoperíodo (B) com vistas a produtividade em biomassa e o teor de lipídeos, enquanto que os fatores aeração (C) e vazão de recirculação de meio de cultivo (D) foram propostos nos níveis 3 e 1, respectivamente, visando a

produtividade de biomassa, e para o teor de lipídeos (C e D no nível 1), ambos pouco influentes.

Assim, para a produtividade lipídica, reduz-se as influências dos fatores A e B, resultando ajustes nos níveis alto (em concordância com o ajuste para a produtividade em biomassa), e mantém-se os níveis alto para o fator C (aeração) e baixo para o fator D (vazão de recirculação), como proposto também para a produtividade em biomassa.

5.2.2 Resultados obtidos durante a Fase 2

5.2.2.1 Concentração de biomassa

Os valores de concentração máxima de biomassa alcançado ao final da fase 2 de cada cultivo experimental estão apresentados na Tabela 5.10 para análise estatística da influência dos fatores sobre a concentração de biomassa.

Tabela 5.10 - Concentração máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 2, empregando-se o fotobiorreator integrado.

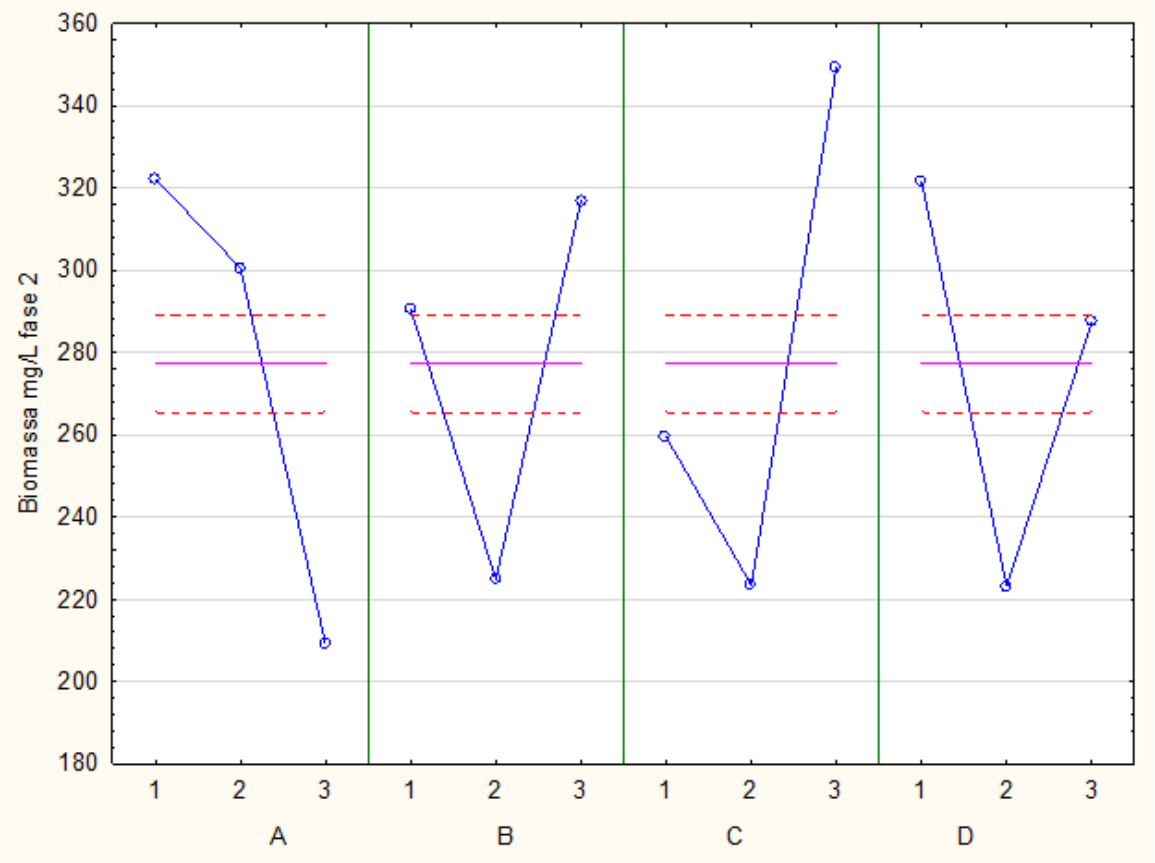
	Fatores				**Concentração de biomassa mg L^{-1}**		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	372	351	**361**
2	1	2	2	2	154	169	**162**
3	1	3	3	3	445	442	**444**
4	2	1	2	3	285	255	**270**
5	2	2	3	1	356	372	**364**
6	2	3	1	2	265	270	**268**
7	3	1	3	2	243	237	**240**
8	3	2	1	3	144	154	**149**
9	3	3	2	1	237	240	**239**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa foram avaliados graficamente conforme ilustra a Figura 5.28. A partir da análise foi

observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24 h claro / 0h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 L.min $^{-1}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelha), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 L min $^{-1}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Figura 5.28 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a concentração de biomassa máxima durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentam significância sobre a concentração de biomassa na fase 2 conforme apresentado na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	43140,28	2	21570,14	204,6492	0,000000
B	26879,39	2	13439,70	127,5107	0,000000
C	50363,36	2	25181,68	238,9141	0,000000
D	29868,68	2	14934,34	141,6913	0,000000
Residual	948,61	9	105,40		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância.

Com base na análise gráfica (Figura 5.28) e análise de variância (Tabela 5.11) da influência dos fatores sobre a concentração da biomassa durante a fase 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo para a fase 2: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$), de forma a se obter os valores mais elevados de concentração de biomassa na fase 2 do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto. Pode-se notar que tal ajuste proposto é semelhante à proposta de ajuste para a obtenção de elevados valores de produtividade em biomassa da *Chlorella minutissima* durante o cultivo na fase 1.

5.2.2.2 Produtividade volumétrica de biomassa

Os valores de produtividade volumétrica máxima de biomassa alcançado ao final da fase 2 de cada cultivo experimental estão apresentados na Tabela 5.12 para análise estatística da influência dos fatores sobre esta variável. A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelha), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator

C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 L.min $^{-1}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

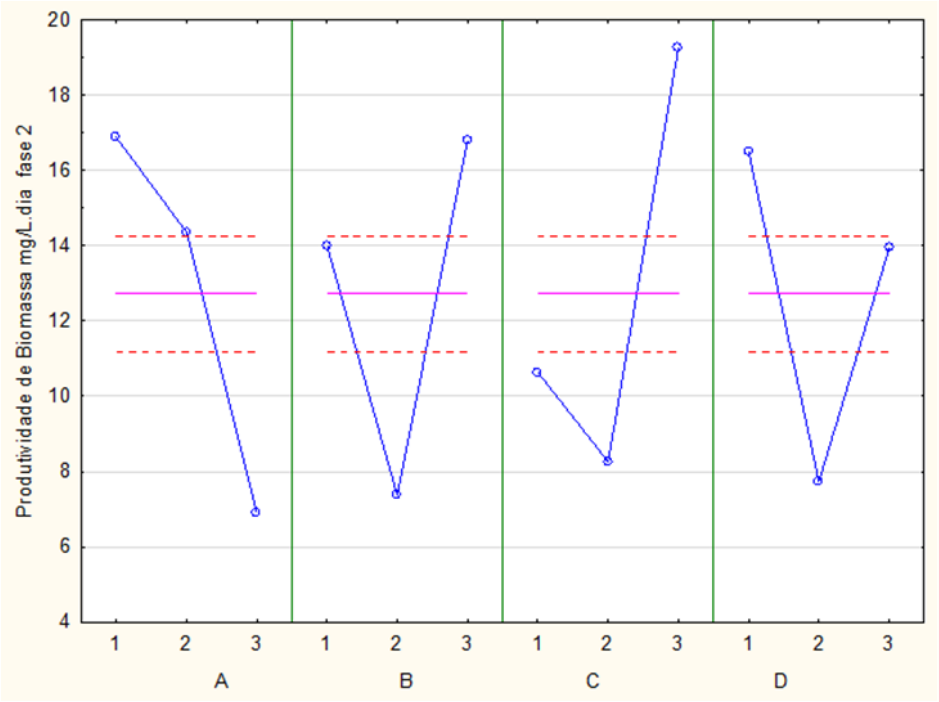
Tabela 5.12 - Produtividade volumétrica máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, ao final da fase 2, empregando o fotobiorreator integrado.

	Fatores				Produtividade Volumétrica de Biomassa mg $L^{-1}d^{-1}$		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	22	18	**20**
2	1	2	2	2	2	3	**2**
3	1	3	3	3	28	30	**29**
4	2	1	2	3	14	11	**12**
5	2	2	3	1	18	20	**19**
6	2	3	1	2	12	11	**11**
7	3	1	3	2	10	9	**10**
8	3	2	1	3	1	1	**1**
9	3	3	2	1	10	11	**10**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a produtividade volumétrica de biomassa, foram avaliados graficamente conforme ilustra a Figura 5.29.

Figura 5.29- Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a produtividade volumétrica máxima de biomassa durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA. Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentam significância sobre a produtividade volumétrica de biomassa na fase 2 conforme apresentado na Tabela 5.12.

Tabela 5.13 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade volumétrica máxima durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	321,9720	2	160,9860	92,3286	0,000001
B	281,1676	2	140,5838	80,6275	0,000002
C	402,4763	2	201,2381	115,4140	0,000000
D	243,5197	2	121,7598	69,8316	0,000003
Residual	15,6926	9	1,7436		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância.

Com base na análise gráfica (Figura 5.29) e análise de variância (Tabela 5.13) da influência dos fatores sobre a produtividade volumétrica da biomassa durante a fase 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo para a fase 2: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$), de forma a se alcançar os valores mais elevados de produtividade volumétrica de biomassa no fotobiorreator integrado proposto para o cultivo de *Chlorella minutissima*.

Cabe destacar que o ajuste proposto pela análise estatística para elevar o valor da variável resposta em estudo (produtividade volumétrica de biomassa na fase 2), é idêntico ao ajuste proposto para a mesma variável resposta na fase 1 e para a concentração de biomassa na fase 2.

5.2.2.3 Teor de Lipídeos

Os valores de teor de lipídeos alcançado ao final da fase 2 de cada cultivo estão apresentados na Tabela 5.14, para análise estatística da influência dos fatores sobre a variável resposta.

Tabela 5.14 - Teor de lipídeos da biomassa de *Chlorella minutissima* alcançado em cada condição experimental do planejamento de Taguchi na fase 2, empregando o fotobiorreator integrado.

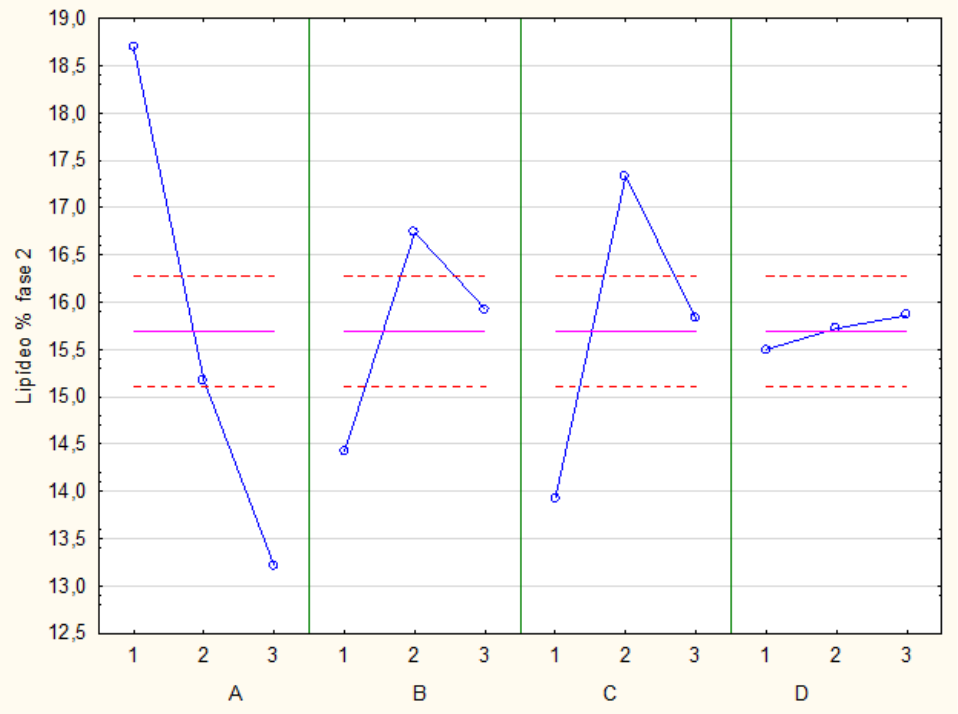
	Fatores				**Teor de lipídeos (%)**		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	15,72	15,20	**15,46**
2	1	2	2	2	21,89	20,90	**21,40**
3	1	3	3	3	20,00	18,44	**19,22**
4	2	1	2	3	15,85	15,55	**15,70**
5	2	2	3	1	16,45	15,85	**16,15**
6	2	3	1	2	13,84	13,50	**13,67**
7	3	1	3	2	11,90	12,30	**12,10**
8	3	2	1	3	12,57	12,75	**12,66**
9	3	3	2	1	14,68	15,10	**14,89**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre o teor de lipídeos avaliados graficamente conforme ilustra a Figura 5.30. A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) independe, decidindo portanto ajustar no menor nível, 1 (5,1 $L.min^{-1}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado.

Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelha), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 1 (12 h claro / 12 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 1 (0,3 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Figura 5.30 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre o teor de lipídeos da biomassa durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que apenas o fator D não apresentou significância sobre o teor de lipídeos na fase 2 conforme apresentado pela Tabela 5.14.

Tabela 5.15 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o teor de lipídeos na biomassa durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto.

Fatores	**SQF**	**GL**	**SMQF**	**F**	**p**
A	92,36568	2	46,18284	179,9916	0,000000
B	16,56534	2	8,28267	32,2806	0,000078
C	34,79681	2	17,39841	67,8080	0,000004
D	0,39574	2	0,19787	0,7712	0,490762
Residual	2,30925	9	0,25658		

Fonte: Autoria própria.
Nota: **SQF**: Soma quadrática dos fatores;
GL: Grau de liberdade;
SMQF: Soma média quadrática dos fatores;
F: Teste F;
p: Nível de significância.

Com base na análise gráfica (Figura 5.30) e análise de variância (Tabela 5.15) da influência dos fatores sobre o teor de lipídeos durante a fase 2, propõe-se o seguinte ajuste

para o processo de cultivo para a fase 2: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$), para se obter os valores mais elevados de teor de lipídeos na biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto.

Destaca-se nesse momento a importância da utilização da estratégia de submeter o cultivo microalgal à uma privação nutricional, mesmo que parcial para a fonte de nitrato, como o que foi realizado no presente trabalho. A deficiência de nitrogênio afeta o metabolismo celular, reduzindo a síntese de proteínas e a taxa fotossintética, enquanto estimula a hidrólise de fosfolipídeos levando ao aumento dos níveis intracelular de ácidos graxos (Xin et al., 2010). O conteúdo de lipídeos foi elevado em comparação com a primeira fase, corroborando com os relatos de Yen; Chang (2013), que observaram elevação nos teores de lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris* quando cultivada tanto em regime autotrófico quanto em regime mixotrófico, na segunda fase do cultivo em relação à primeira fase.

Comparado à fase 1, para a mesma variável resposta (teor de lipídeos), houve conflito de ajuste principalmente para o fator significativamente mais influente (A - cor da iluminação) que, para a fase 1, foi sugerido o nível 3 (vermelho), enquanto que para a fase 2 foi proposto o nível 1 (azul), seguido de divergência para o ajuste do fator C (aeração), que sugeriu nível baixo na fase 1 e nível intermediário na fase 2.

Considerando que a fase 2 configura uma condição de estresse nutricional para as microalgas, a prolongação do cultivo exige que as células aproveitem ao máximo o fornecimento de energia luminosa. Assim, quando o cultivo é conduzido sob iluminação vermelha (como sugerido durante a fase 1 para o acúmulo de lipídeos), fornece-se menos energia luminosa para as células reservarem sob a forma de lipídeos, diferentemente do que ocorre quando o cultivo é iluminado com a cor azul, que disponibiliza maior nível energético para o micro-organismo acumular este metabólito.

Ainda para compensar a escassez nutricional, o emprego de maior nível de aeração (do nível baixo na fase 1, para o nível intermediário na fase 2), garante maior disponibilidade da fonte de carbono proveniente do CO_2 presente no ar injetado no cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, justificando esta proposta de ajuste na aeração para acumular lipídeos.

5.2.2.4 Produtividade Lipídica

Os valores de produtividade lipídica alcançado ao final da fase 2 de cada cultivo experimental seguem apresentados na Tabela 5.16 para análise estatística da influência dos fatores sobre a variável resposta.

Tabela 5.16 - Produtividade lipídica do cultivo de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi na fase 2, empregando o fotobiorreator integrado.

	Fatores				Produtividade Lipídica $mg.L^{-1}.d^{-1}$		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Média**
1	1	1	1	1	3,42	2,73	**3,07**
2	1	2	2	2	0,36	0,53	**0,44**
3	1	3	3	3	5,56	5,46	**5,51**
4	2	1	2	3	2,15	1,75	**1,95**
5	2	2	3	1	3,03	3,21	**3,12**
6	2	3	1	2	1,68	1,43	**1,55**
7	3	1	3	2	1,21	1,15	**1,18**
8	3	2	1	3	0,07	0,11	**0,09**
9	3	3	2	1	1,44	1,62	**1,53**

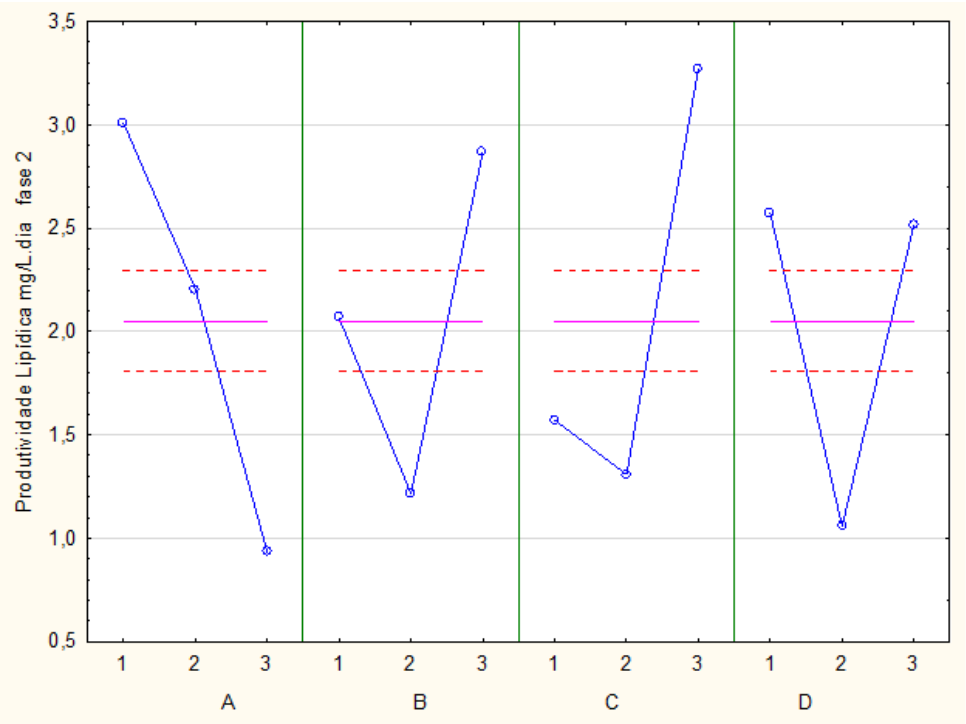
Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica foi avaliado graficamente conforme ilustra a Figura 5.31.

A partir da análise foi observado que todos os fatores avaliados influenciam a variável resposta, sendo que, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 $L.min^{-1}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado.

Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 3 (vermelha), o fator B (fotoperíodo) está ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) está ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 2 (6,6 $L.min^{-1}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Figura 5.31 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a produtividade lipídica durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores estudados apresentam significância sobre a produtividade lipídica na fase 2 conforme apresentado pela Tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade lipídica durante a fase 2 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	13,14003	2	6,570014	145,6920	0,000000
B	8,17696	2	4,088478	90,6632	0,000001
C	13,59936	2	6,799680	150,7849	0,000000
D	8,86061	2	4,430303	98,2432	0,000001
Residual	0,40586	9	0,045095		

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

Com base na análise gráfica (Figura 5.31) e análise de variância (Tabela 5.17) da influência dos fatores sobre a produtividade lipídica durante a fase 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo para a fase 2: fator A (iluminação) ajustado no nível 1

(azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 1 (5,1 L.min $^{-1}$) ou nível 2 (6,6 L.min $^{-1}$) de modo a se obter os valores mais elevados de produtividade lipídica durante o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto na fase 2. Cabe destacar que o ajuste proposto é idêntico para elevar a mesma variável resposta durante a fase 1.

5.2.3 Avaliação das variáveis respostas entre as fases

5.2.3.1 Concentração de biomassa

A variação da concentração de biomassa obtida entre as fases 1 e 2 para cada condição experimental foi determinada em termos percentuais e utilizada como variável resposta do planejamento utilizado, conforme apresentada na Tabela 5.18. Foi possível verificar que as variações mais expressivas foram em relação ao aumento da concentração de biomassa entre uma fase e outra, destacando-se a elevação de 21,90% da concentração de biomassa ocorrida no experimento 3. Por outro lado, a diminuição mais expressiva da concentração de biomassa (-4,48 %), foi verificada no experimento 2.

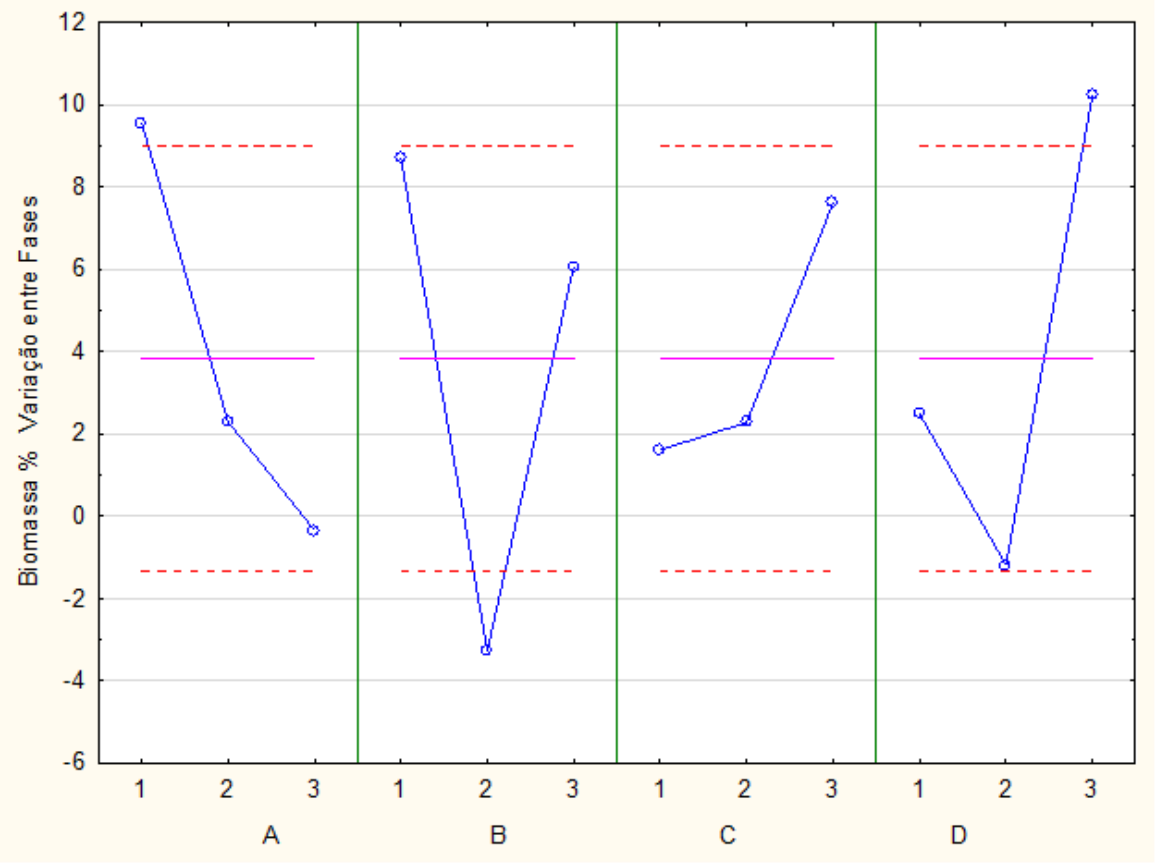
Tabela 5.18 - Variação da concentração máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi entre as fases 1 e 2, empregando-se o fotobiorreator integrado.

	Fatores				**Biomassa mg L^{-1}**		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Fase 1 (média)**	**Fase 2 (média)**	**Variação (%)**
1	1	1	1	1	326,01	361,42	**10,86**
2	1	2	2	2	169,19	161,61	**-4,48**
3	1	3	3	3	363,95	443,62	**21,90**
4	2	1	2	3	241,28	269,86	**11,85**
5	2	2	3	1	372,80	363,95	**-2,37**
6	2	3	1	2	275,42	267,84	**-2,75**
7	3	1	3	2	232,43	240,01	**3,26**
8	3	2	1	3	154,02	148,96	**-3,28**
9	3	3	2	1	241,28	238,75	**-1,05**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação percentual da concentração de biomassa, foram avaliadas graficamente conforme ilustra a Figura 5.32. A partir da análise, pode-se observar que o fator C pouco influenciou a variável resposta. Desta forma, quando o fator A (iluminação) está ajustado no nível 1 (azul), resulta a elevação da concentração de biomassa entre as fases 1 e 2, assim como o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 3 (9,0 L min $^{-1}$), influencia na elevação da concentração de biomassa entre as fases. Por outro lado, o fator B (fotoperíodo), quando ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), resulta em redução na concentração de biomassa entre as duas fases.

Figura 5.32 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação da concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado, entre as fases 1 e 2.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que apenas o fator C (aeração) não apresenta efeito significativo sobre a variação percentual da concentração de biomassa, conforme apresentado na Tabela 32.

Tabela 5.19.- Análise de variância dos fatores estudados sobre a concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	316,1857	2	158,0929	7,84735	0,010651
B	473,3803	2	236,6902	11,74873	0,003096
C	130,0640	2	65,0320	3,22803	0,087730
D	406,8904	2	203,4452	10,09853	0,005013
Residual	181,3141	9	20,1460		

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

Com base na análise gráfica (Figura 5.32) e análise de variância (Tabela 5.19) da influência dos fatores sobre a variação percentual da concentração de biomassa entre as fases 1 e 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo: fator A (cor da iluminação) ajustada no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 1 (12 h claro / 12 h escuro), fator C no nível 3 (0,5 vvm) e o fator D (vazão de recirculação) ajustado no nível 3 (9,0 $L.min^{-1}$), de modo a garantir melhores resultados de aumento da concentração de biomassa de *Chlorella minutissima* empregando o fotobiorreator integrado proposto.

Cabe destacar que o fator que mais influenciou significativamente a concentração de biomassa da microalga entre as duas fases foi o fotoperíodo (fator B), levando à redução da concentração da biomassa se ajustado no nível 2 (1 h claro: 1 h escuro) pois, nessa condição, o cultivo não dispõe de energia luminosa por tempo suficiente para resultar um crescimento celular importante.

5.2.3.2 Produtividade volumétrica de biomassa

A variação da produtividade volumétrica de biomassa obtida entre as fases 1 e 2 para cada condição experimental foi determinada em termos percentuais e utilizada como variável resposta do planejamento utilizado conforme apresentado na Tabela 5.20. Verificou-se expressiva queda na produtividade em todos os ensaios, decorrente do prolongamento do período de cultivo sem o correspondente aumento da concentração de biomassa. Destacam os experimentos 2, 8 e 9, com quedas na produtividade volumétrica de biomassa de 57,10 %, 56,70 % e 54,15 %, respectivamente.

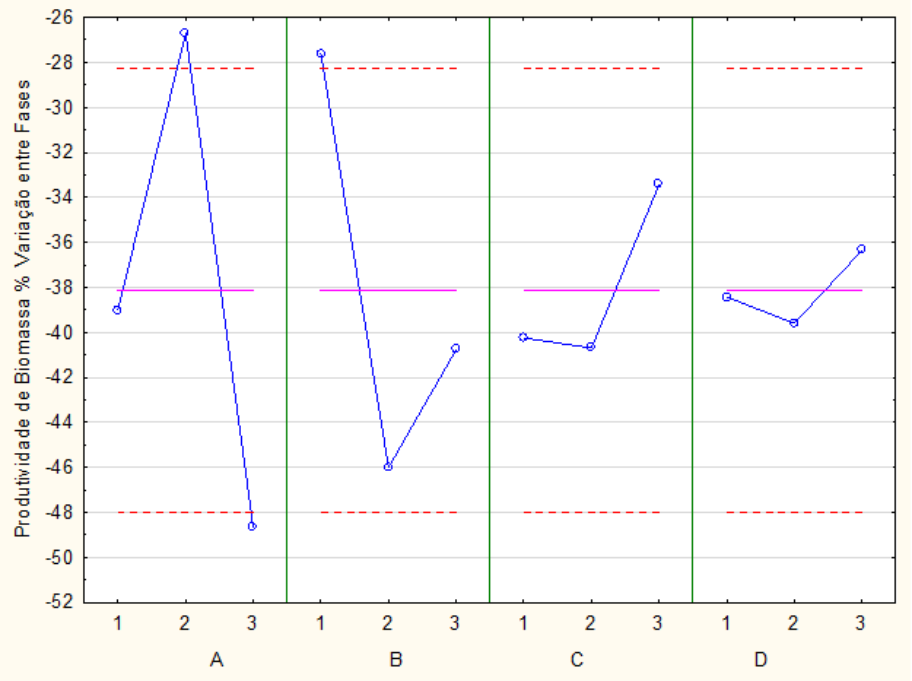
Tabela 5.20 - Variação da produtividade volumétrica máxima de biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi entre as fases 1 e 2, empregando o fotobiorreator integrado.

	Fatores				Produtividade Volumétrica de Biomassa $mg.L^{-1}.d^{-1}$		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Fase 1 (média)**	**Fase 2 (média)**	**Variação (%)**
1	1	1	1	1	28,67	19,85	**-30,80**
2	1	2	2	2	4,84	2,08	**-57,10**
3	1	3	3	3	44,29	28,76	**-35,15**
4	2	1	2	3	14,96	12,40	**-17,14**
5	2	2	3	1	27,66	19,31	**-30,18**
6	2	3	1	2	16,93	11,35	**-32,94**
7	3	1	3	2	14,99	9,75	**-34,94**
8	3	2	1	3	1,64	0,71	**-56,70**
9	3	3	2	1	22,44	10,29	**-54,15**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação percentual da produtividade volumétrica de biomassa foi avaliadas graficamente conforme ilustra a Figura 5.33.

Figura 5.33 - Gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação da produtividade volumétrica de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2.



Fonte: Autoria própria.

A partir da análise foi observado que apenas os fatores A (iluminação) e B (fotoperíodo) exercem influência sobre a variável resposta, sendo que quando o primeiro fator é ajustado na iluminação branca (nível 2) e o segundo fator é ajustado com 12 h claro / 12 h escuro (nível 1) a variável resposta sofre a menor variação em termos percentuais, enquanto que os fatores C e D pouco influenciam na resposta.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, foi verificado que os fatores C (aeração) e D (vazão de recirculação de meio) não apresentam efeito significativo sobre a variação percentual da produtividade volumétrica de biomassa, conforme apresentado pela Tabela 5.21.

Tabela 5.21 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a variação da produtividade volumétrica de biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	1450,457	2	725,2286	9,942091	0,005262
B	1075,850	2	537,9250	7,374364	0,012697
C	198,785	2	99,3924	1,362561	0,304133
D	32,335	2	16,1676	0,221641	0,805449
Residual	656,508	9	72,9453		

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

Com base na análise gráfica (Figura 5.33) e análise (Tabela 5.21) de variância da influência dos fatores sobre a variação percentual da produtividade volumétrica de biomassa da microalga entre as fases 1 e 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo: fator A (iluminação) ajustado no nível 2 (branco), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 1 (12 h claro / 12 h escuro) e os fatores C (aeração) e D (vazão de recirculação de meio) ajustados no nível 1, visto que não influenciam a variável resposta. Neste caso, o ajuste das condições experimentais mencionado teria o propósito de diminuir a queda da produtividade em biomassa, e não de aumentar o seu valor.

A queda na produtividade em biomassa da microalga *Chlorella minutissima* deve-se principalmente à privação do nitrogênio, pois as microalgas necessitam dispor deste elemento em abundância para garantir a plena realização da fotossíntese, essencial para o crescimento celular e formação de biomassa (ZHAO et al., 2017).

Uma alternativa para minimizar a queda de produtividade em biomassa com a segunda fase do cultivo, poderia ser a utilização de uma fonte orgânica de carbono, como a injeção de glicose durante a segunda fase, como sugerido por Yen; Chang (2013), conduzindo a primeira fase em regime autotrófico e a segunda fase em regime mixotrófico, possibilitando o aumento do crescimento celular.

5.2.3.3 Teor de lipídeos

A variação dos teores de lipídeos alcançados entre as fases 1 e 2 para cada condição experimental foi determinada em termos percentuais e utilizada como variável resposta do planejamento utilizado conforme apresentado na Tabela 35. Foi observado que o conteúdo lipídico se elevou em todos os cultivos experimentais entre as fases 1 e 2, destacando os experimentos 3 e 2 como os mais expressivos, com 269,61% e 177,86%, respectivamente.

Tabela 5.22 - Variação do teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi entre as fases 1 e 2, empregando o fotobiorreator integrado.

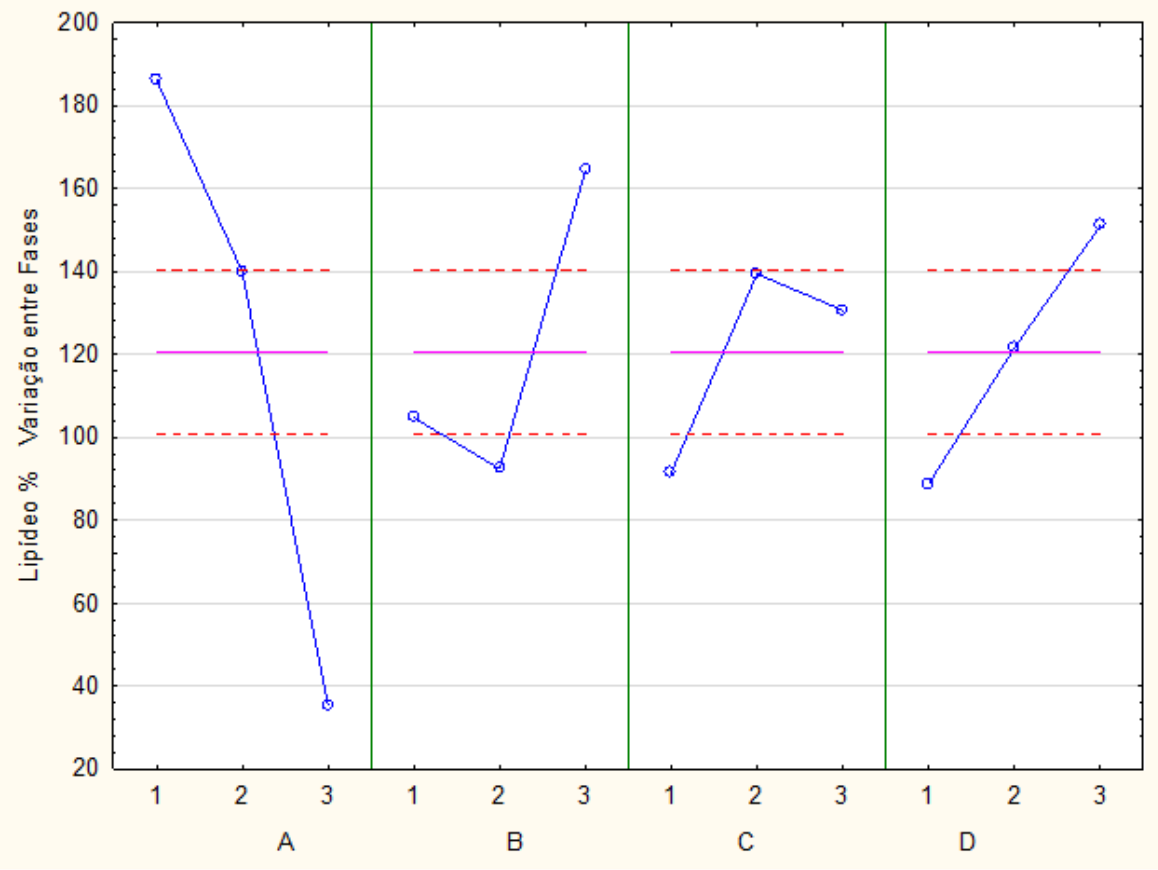
	Fatores				**Teor de lipídeos (%)**		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Fase 1(média)**	**Fase 2 (média)**	**Variação (%)**
1	1	1	1	1	7,38	15,46	**109,63**
2	1	2	2	2	7,70	21,40	**177,86**
3	1	3	3	3	5,20	19,22	**269,61**
4	2	1	2	3	5,75	15,70	**173,04**
5	2	2	3	1	8,50	16,15	**90,00**
6	2	3	1	2	5,35	13,67	**155,51**
7	3	1	3	2	9,25	12,10	**30,81**
8	3	2	1	3	11,65	12,66	**8,66**
9	3	3	2	1	8,95	14,89	**66,36**

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação percentual da produtividade volumétrica de biomassa foi avaliada graficamente conforme ilustra a Figura 5.34. A partir da análise foi observado que quando o fator A (iluminação) é ajustado no nível

1 (azul), o fator B (fotoperíodo) é ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), o fator C (aeração) é ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e o fator D (vazão de recirculação de meio) é ajustado no nível 3 (9,0 L min $^{-1}$), a variável resposta tem seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) é ajustado no nível 3 (vermelho), o fator B (fotoperíodo) é ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), o fator C (aeração) é ajustado no nível 1 (0,3 vvm) e o fator D (vazão de recirculação de meio) é ajustado no nível 1 (5,1 L.min $^{-1}$), a variável resposta tem seu valor minimizado.

Figura 5.34 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variação do teor de lipídeos na biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, a partir da análise de variância realizada foi verificado que todos os fatores apresentam significância sobre a variação percentual do teor lipídico de biomassa entre as fases 1 e 2, conforme apresentado na Tabela 36.

Tabela 5.23 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a variação do teor de lipídeos da biomassa de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, entre as fases 1 e 2.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	71652,90	2	35826,45	122,1758	0,000000
B	17773,00	2	8886,50	30,3048	0,000100
C	7807,44	2	3903,72	13,3125	0,002047
D	11629,40	2	5814,70	19,8294	0,000503
Residual	2639,13	9	293,24		

Fonte: Autoria própria
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

Desse modo, com base nas análises gráfica (Figura 5.34) e de variância (Tabela 5.23) da influência dos fatores sobre a variação percentual do teor de lipídeos entre as fases 1 e 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no nível 2 (0,4 vvm) e fator D (vazão de recirculação de meio) ajustado no nível 3 (9,0 $L.min^{-1}$), de modo a se obter as maiores elevações de teores lipídicos na biomassa da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.

Ao contrário do que ocorre com a produtividade em biomassa da microalga *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, a segunda fase garante elevações dos teores de lipídeos maiores que 100% nos cultivos iluminados por 24h diárias, sob iluminação azul e 9,0 L min^{-1} de vazão de recirculação de meio de cultivo.

A variação dos teores de lipídeos entre as fases envolvidas neste trabalho evidencia a importância da utilização desta estratégia. As elevações dos teores de lipídeos obtidas na segunda fase dos cultivos realizados neste trabalho corroboraram com os relatos da literatura que observaram elevações nos teores de lipídeos das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Desmodesmus* sp. durante a realização da segunda etapa de cultivo sob privação da fonte de nitrogênio (RIOS et al., 2015; HO; CHEN; CHANG, 2012).

5.2.3.4 Produtividade lipídica

As variações das produtividades lipídicas de biomassa alcançadas entre as fases 1 e 2 para cada condição experimental foram determinadas em termos percentuais e utilizadas como variáveis resposta do planejamento utilizado conforme apresentado na Tabela 5.24. Foi observado que todos os cultivos iluminados com a luz vermelha (experimentos 7, 8 e 9) sofreram quedas na produtividade lipídica (-14,85 %, -52,85 % e -23,70 %, respectivamente) entre as fases 1 e 2 enquanto que o experimento 3 proporcionou a maior elevação (139,21 %) na produtividade lipídica entre as fases 1 e 2.

Tabela 5.24 - Variação da produtividade lipídica de *Chlorella minutissima* alcançada em cada condição experimental do planejamento de Taguchi, entre as fases 1 e 2, empregando o fotobiorreator integrado.

	Fatores				Produtividade lipídica $mg.L^{-1}.d^{-1}$		
Experimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**Fase 1(média)**	**Fase 2(média)**	**Variação (%)**
1	1	1	1	1	2,11	3,07	**45,42**
2	1	2	2	2	0,38	0,44	**17,92**
3	1	3	3	3	2,30	5,51	**139,21**
4	2	1	2	3	0,86	1,95	**126,58**
5	2	2	3	1	2,35	3,12	**32,72**
6	2	3	1	2	0,90	1,55	**71,82**
7	3	1	3	2	1,38	1,18	**-14,85**
8	3	2	1	3	0,19	0,09	**-52,85**
9	3	3	2	1	2,01	1,53	**-23,70**

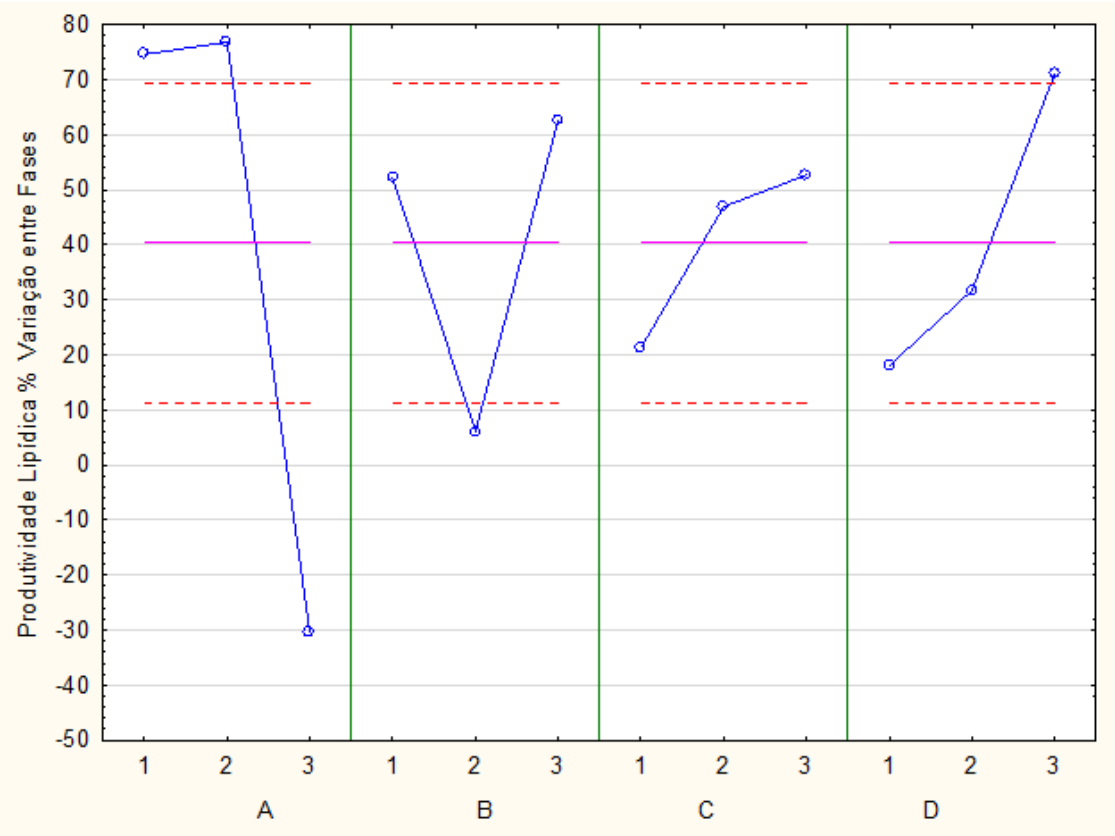
Fonte: Autoria própria

Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

A influência dos efeitos dos fatores estudados sobre a variação percentual da produtividade lipídica na biomassa foi avaliada graficamente conforme ilustra a Figura 5.35. A partir da análise foi observado que quando o fator A (iluminação) é ajustado tanto no nível 1 (azul) quanto no nível 2 (branco) e o fator D (vazão de recirculação de meio) é ajustado no nível 3 (9,0 $L.min^{-1}$), a variável resposta tem seu valor maximizado.

Em contrapartida, quando o fator A (iluminação) é ajustado no nível 3 (vermelho) e o fator B (fotoperíodo) é ajustado no nível 2 (1 h claro / 1 h escuro), a variável resposta tem seu valor minimizado.

Figura 5.35 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variação da produtividade lipídica de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado proposto, entre as fases 1 e 2.



Fonte: Autoria própria.

Para verificar a significância da influência dos fatores sobre a variável resposta, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Desse modo, apenas o fator C (aeração) não apresentou efeito significativo sobre a variação percentual da produtividade lipídica da entre a microalga entre as fases 1 e 2, conforme apresentado na Tabela 5.25.

Tabela 5.25 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a variação da produtividade lipídica de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto, entre as fases 1 e 2.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	45093,38	2	22546,69	35,94373	0,000051
B	10854,44	2	5427,22	8,65203	0,008017
C	3340,17	2	1670,09	2,66244	0,123504
D	9113,14	2	4556,57	7,26404	0,013242
Residual	5645,50	9	627,28		

Fonte: Autoria própria

Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

Desse modo, com base nas análises gráfica (Figura 5.35) e de variância (Tabela 5.25) da influência dos fatores sobre a variação percentual da produtividade lipídica entre as fases 1 e 2, propõe-se o seguinte ajuste para o processo de cultivo: fator A (iluminação) ajustado no nível 1 (azul) ou nível 2 (branco), fator B (fotoperíodo) ajustado no nível 3 (24 h claro / 0 h escuro), fator C (aeração) ajustado no menor nível (pois não tem influência significativa sobre a resposta) e o fator D (vazão de recirculação de meio) ajustado no nível 3 (9,0 $L.min^{-1}$). Desta forma, deve-se alcançar valores mais elevados de aumento da produtividade lipídica da primeira para a segunda fase do cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto.

5.2.4 Experimento confirmatório

Diante das análises dos efeitos dos fatores sobre as variáveis respostas (Concentração de Biomassa; Produtividade Volumétrica de Biomassa; Teor de Lipídeos e Produtividade Lipídica) para as fases 1 e 2 foram propostos diversos ajustes de processos visando maximizar cada uma das variáveis respostas estudadas. A Tabela 5.26 apresenta os possíveis ajustes previstos com base nas análises realizadas.

Tabela 5.26 - Propostas de ajustes dos níveis dos fatores estudados no cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado, segundo análises estatísticas realizadas, visando maximizar cada uma das variáveis respostas.

Objetivo		Fatores			
	Fase	**A**	**B**	**C**	**D**
Elevar a Concentração de biomassa (X)	1	2	3	3	1
	2	1	3	3	1
Elevar a Produtividade Volumétrica de biomassa (P)	1	1	3	3	1
	2	1	3	3	1
Elevar o teor de Lipídeos (L)	1	3	2	1	1
	2	1	2	2	1, 2 ou 3
Elevar a Produtividade Lipídica (PL)	1	1	3	3	1
	2	1	3	3	1 ou 2

Fonte: Autoria própria

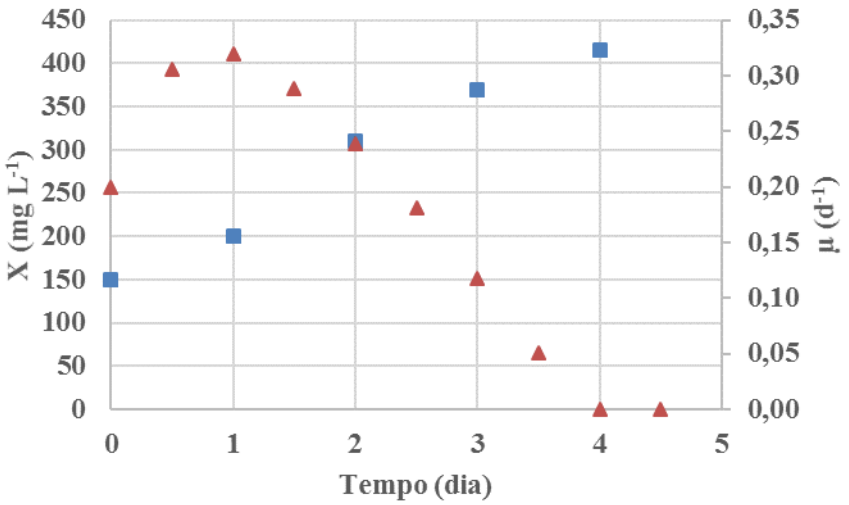
Nota: A= Iluminação;
B= Fotoperíodo;
C= Aeração;
D= Vazão de recirculação de meio

Levando em consideração o processo completo (em duas fases), a configuração proposta de iluminação azul (fator A no nível 1), o fotoperíodo de 24 h claro / 0 h escuro (fator B no nível 3), a aeração de 0,5 vvm (fator C no nível 3) e a vazão de recirculação de meio de cultivo em 5,1 L.min $^{-1}$ (fator D no nível 1) atende à maximização da concentração de biomassa, produtividade volumétrica de biomassa e da produtividade lipídica. Como tal configuração proposta não foi prevista na matriz experimental, foi realizado um experimento confirmatório obedecendo o ajuste proposto.

A configuração proposta visando a maximização do teor de lipídeos ao fim dos cultivos (fase 2) que prevê iluminação azul (fator A no nível 1), fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro (fator B no nível 2), aeração de 0,4 vvm (fator C no nível 2) e vazão de recirculação independentemente do valor (fator D 1, 2 ou 3) já foi experimentada conforme o planejamento executado e confirmado com o maior teor de lipídeos obtido (experimento 2), dispensando a necessidade de confirmação.

Desse modo, o experimento confirmatório realizado apresentou o melhor desempenho no perfil do crescimento celular, garantindo uma máxima velocidade específica de crescimento de 0,32 d $^{-1}$ no primeiro dia de cultivo no regime descontínuo, configurado pela fase 1, superando o maior valor obtido no experimento 2 do planejamento inicial (0,19 d $^{-1}$). A Figura 5.36 apresenta o perfil de crescimento da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado, com os fatores configurados de acordo com o melhor ajuste indicado pela análise estatística, durante o experimento confirmatório.

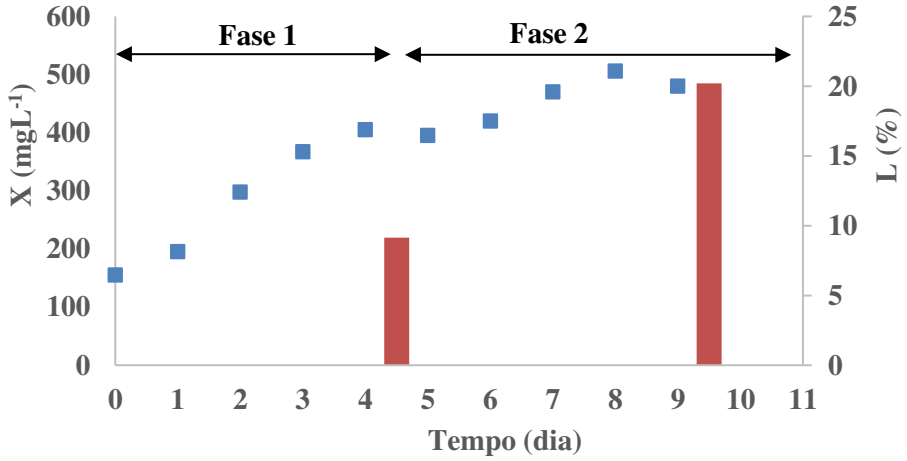
Figura 5.36 - Perfis do crescimento celular X (-■) e velocidade específica de crescimento μ (▲), em função do tempo, durante a fase 1 do cultivo de *Chlorella minutissima* no fotobiorreator proposto, referente ao experimento confirmatório.



Fonte: Autoria própria.

O teor de lipídeos foi elevado em 2,21 vezes entre as fases 1 e 2, durante o experimento confirmatório, de 9,15 % para 20,20 % ao final da fase 2. A concentração máxima de biomassa alcançada também foi elevada de 405 para 506 mg L^{-1} entre as fases 1 e 2, respectivamente. A Figura 5.37 mostra o crescimento da biomassa ao longo dos dias entre as fases 1 e 2, bem como o teor de lipídeos ao fim de cada fase, referente ao ensaio confirmatório

Figura 5.37 - Concentração de biomassa (X) durante o cultivo de *Chlorella minutissima* em função do tempo (■) e teor de lipídeos (L) da biomassa ao final de cada fase do cultivo (■) no fotobiorreator integrado proposto , referente ao ensaio confirmatório.



Fonte: Autoria própria.

Em termos de produtividade volumétrica de biomassa (P) e lipídica (PL) o experimento confirmatório proporcionou as melhores respostas em relação aos resultados obtidos em todos os experimentos da fase exploratória (planejamento), indicando a eficácia do estudo. Na fase 1 obteve-se uma produtividade volumétrica de biomassa de 62,5 mg L^{-1} d^{-1} enquanto na fase 2 houve uma queda de 29,6%, resultando 39 mg L^{-1} d^{-1}. Ainda assim, os valores são superiores aos experimentos previstos no planejamento em ambas as fases. A produtividade volumétrica de lipídeos apresentou um aumento de 55,59 % entre as fases 1 e 2, de 5,72 para 8,9 mg L^{-1} d^{-1}de lipídeos, respectivamente, superando todos os valores de produtividade em lipídeos dos cultivos com as condições da matriz experimental.

Na Tabela 5.27 apresentam-se os resultados das variáveis respostas das fases 1 e 2 alcançados durante a realização do experimento confirmatório. Nota-se um melhor desempenho em todas as variáveis respostas, com exceção da variável “teor de lipídeos” que

teve como melhor resultado 21,40% na condição experimental 2 do planejamento experimental inicial.

Tabela 5.27 - Resultados obtidos com o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado, referente ao ensaio confirmatório nas fases 1 e 2.

Variável resposta	Fase 1	Fase 2	Variação entre fases (%)
Concentração de biomassa (mgL^{-1})	405	506	24,94
Produtividade Volumétrica de Biomassa ($mg\ L^{-1} d^{-1}$)	62,5	44	-29,60
Teor de Lipídeos (%)	9,15	20,2	120,77
Produtividade volumétrica de lipídeos ($mg\ L^{-1} d^{-1}$)	5,72	8,9	55,59

Fonte: Autoria própria.

Com a realização dos experimentos previstos na matriz experimental observaram-se variações de concentração de biomassa entre 161,61 e 443,62 $mg\ L^{-1}$ (Tabela 5.18), variações de produtividades volumétricas de biomassa entre 0,71 e 44,29 $mg\ L^{-1} d^{-1}$ (Tabela 5.20), teores de lipídeos entre 5,20 % e 21,40 % (Tabela 5.22) e produtividades volumétricas de lipídeos entre 0,09 e 5,51 $mg\ L^{-1} d^{-1}$ (Tabela 5.24), indicando que os fatores estudados e sua devida configuração determinam o desempenho do cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* no fotobiorreator integrado proposto no presente trabalho.

É importante destacar que o desempenho de cultivos microalgais dependem da espécie utilizada, tipo de iluminação (natural ou artificial, fotoperíodo e comprimento de onda), modo de condução do cultivo (contínuo, descontínuo ou semi-descontínuo), temperatura, tipo de fotobiorreator, pH, composição do meio de cultivo (destacando nutrientes como glicose, acetatos, nitratos e fosfatos) e regimes de cultivo (autotrófico, heterotrófico e mixotrófico) (SHUBA; KLIFE, 2018; YADAV;SEM, 2017; LEE et al., 2015).

Sendo assim, com relação à iluminação, sabe-se que a luz azul dispõe de aproximadamente 40% mais energia do que a luz vermelha, e assim desempenha papel essencial ao metabolismo e crescimento celular das microalgas. (OKUMURA et al. ,2014).

Nesse sentido, o fotoperíodo se relaciona cumulativamente com a qualidade da iluminação, uma vez que, longos períodos de iluminação fornecem mais energia dos fótons ao cultivo, enquanto que curtos períodos proporcionam menores valores de energia ao

cultivo. Assim, com o intuito de elevar o conteúdo de lipídeos nas células microalgais, têm-se utilizado estratégias de estressar o cultivo com curtos períodos de iluminação ou até mesmo intercalando períodos com e sem iluminação (ABU-GOSHI, 2016; LIAO et.al, 2014; ATTA et al., 2013).

Considerando o fator iluminação nos experimentos realizados no presente estudo, as análises estatísticas indicaram que a iluminação azul durante 24 h por dia favoreceu o crescimento celular tanto na fase 1 quanto na fase 2, traduzindo nos maiores valores de produtividade de biomassa e velocidades específicas de crescimento, enquanto que a iluminação vermelha, num fotoperíodo de 1 h claro / 1 h escuro foi indicada para favorecer o acúmulo de lipídeos na fase 1 dos cultivos, corroborando com os relatos da literatura a respeito da iluminação.

No que diz respeito a fonte de carbono nos cultivos fotoautotróficos, essencial para a realização da fotossíntese e formação da biomassa, o CO_2 atmosférico que é inserido ao cultivo através da aeração é a única fonte disponível para os cultivos, relacionando-se diretamente com o crescimento celular (BRENNAN; OWENDE, 2010; BECKER, 1994). Assim sendo, justifica-se adequadamente com a análise estatística realizada a indicação da aeração no nível 3 (0,5 vvm) para promover o melhor crescimento celular nos cultivos.

Já a vazão de recirculação de meio de cultivo dentro do fotobiorreator integrado aqui proposto, sugere-se que o menor nível (5,1 $L.min^{-1}$) favoreceu tanto a produtividade celular (fase 1 e 2) quanto o acúmulo de lipídeos (fase 1) de acordo com a análise estatística. Tal sugestão pode ser explicada pelo fato que, na menor vazão, disponibiliza-se maior tempo para o meio de cultivo percorrer a configuração tubular do referido fotobiorreator, que apresenta como principal vantagem a melhor "aproximação" das células do meio de cultivo com a iluminação. Assim, maior tempo de exposição próximo a iluminação pode favorecer a formação da biomassa quando a iluminação for de cor azul.

Objetivando acúmulos de lipídeos cada vez maiores, muitos autores têm relatado submeter as espécies de microalgas a períodos de estresse por privação de nutrientes, com destaque para a fonte de nitrato, que tem se relacionado inversamente ao teor de lipídeos acumulado pela célula (privação de nitrato estimula a síntese de lipídeos pela célula, porém prejudica o crescimento celular). Assim realiza-se o cultivo em duas etapas, sendo a primeira etapa para promover a formação da biomassa e a segunda, sob privação nutricional, para acumular óleo (ARORA et al., 2016; CAO et al., 2014). Diante disso, verificou-se também que a estratégia de submeter os cultivos a uma etapa de privação parcial da fonte de nitrato

(fase 2), foi adequada, pois em todos os cultivos observou-se uma elevação do conteúdo lipídico ao final da fase 2.

Com base no que foi exposto e considerando o regime de cultivo fotoautotrófico somente abastecido com CO_2 atmosférico, proveniente da aeração no fotobiorreator integrado com iluminação interna, com capacidade útil de 20 L, foram alcançadas concentrações de biomassa (405 mg L^{-1} na fase 1; 506 mg L^{-1} na fase 2, apresentadas na Tabela 5.27) superiores, e produtividades de biomassa (62,5 mg L^{-1} d^{-1} na fase 1; 44 mg L^{-1} d^{-1} na fase 2, apresentadas na Tabela 5.27) comparáveis aos resultados obtidos por Loures et al. (2018), que alcançaram 340 mg.L^{-1} e 48,7 mg L^{-1} d^{-1} de concentração e produtividade de biomassa, respectivamente, no cultivo de 20 L da microalga *Chlorella minutissima* em fotobiorreator coluna de bolhas externamente iluminado por lâmpadas fluorescentes, com fornecimento de CO_2 gasoso, e Khan et al. (2018), que obtiveram a concentração de biomassa de 183 mg.L^{-1} quando cultivaram *Chlorella minutissima* em efluente aerado com biogás em tanques de 12 L.

Segundo relatos de Kobayashi et al. (2015), a microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em fotobiorreatores do tipo "bag" alcançou 379 mg L^{-1} de concentração máxima de biomassa, enquanto que as microalgas *C. sorokianiana* e *C. protothecoide*, quando cultivadas em fotobiorreatores do tipo tanque, atingiram a máxima concentração de biomassa de 283,03 e 262,73 mg L^{-1}, respectivamente.

Em se tratando de acúmulo de lipídeos, os experimentos realizados mostraram que o fotobiorreator proposto, aliado à estratégia de submeter o cultivo a uma fase de privação nutricional, proporcionou resultados satisfatórios, tendo em vista que conseguiu-se elevar em 2,21 vezes o conteúdo lipídico das células da *Chlorella minutissima*, de 9,15 para 20,2% entre as fases 1 e 2 (Tabela 5.27), segundo o ajuste proposto pela análise estatística. Os resultados em termos lipídicos mostraram-se semelhantes ao obtido por Cao et al. (2014), que elevou em 2,25 vezes o conteúdo lipídico das células da *Chlorella minutissima*, atingindo 29,2 % em cultivos mixotróficos em frascos de 500 mL, e de Khan et al. (2018), que obtiveram teores de lipídeos entre 22,42 e 26% na biomassa de *Chlorella minutissima* quando cultivada em meio BG11 aerado com biogás. Tais resultados são também superiores àqueles obtido por Li et al. (2011), que alcançaram o teor lipídico de 16,11% sob condições otimizadas, num cultivo mixotrófico de *Chlorella minutissima* em frascos de 500 mL.

No presente trabalho, o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* foi realizado em meio Guilard f/2 em regime autotrófico, para minimizar "grandes efeitos interferentes" relacionados a fontes nutricionais, pois pretendeu-se avaliar apenas as influências dos fatores

físicos (iluminação; fotoperíodo; aeração e vazão de recirculação de meio) que envolvem a operação do fotobiorreator integrado proposto.

Diante disso, pode-se considerar que os resultados obtidos (Concentração de biomassa; produtividade de biomassa; teor lipídico e produtividade lipídica) com o fotobiorreator proposto neste trabalho são promissores, garantindo assim a adequação e aplicabilidade do referido fotobiorreator para o cultivo de microalgas com vistas à obtenção de biomassa. Ficou evidente também, após a conclusão e análise dos resultados dos cultivos, que há muitas possibilidades de desenvolvimento de estudos e trabalhos utilizando o fotobiorreator proposto, as quais serão descritas no item 7 (Sugestões para Trabalhos futuros).

5.3 Perfil dos ácidos graxos extraídos e propriedades estimadas do biodiesel

Os cultivos realizados nas condições experimentais relativos aos experimentos 3, 5 e 9 proporcionaram as maiores produtividades lipídicas para as iluminações azul, branco e vermelho, respectivamente. A partir dos óleos obtidos da biomassa cultivada em cada um desses experimentos, foi determinada a composição em massa dos ácidos graxos presentes, verificando-se a predominância de ácidos graxos saturados, em especial o ácido palmítico, como pode ser visto na Tabela 5.28.

Foi observado que o perfil dos ácidos graxos extraídos da *Chlorella minutissima* cultivada sob iluminação azul apresentou 70,81% de ácidos graxos saturados, dentre os quais prevaleceu o ácido palmítico (C16:0) com 46,51%, enquanto que ácido esteárico (C18:0) correspondeu apenas 3,99% em massa. Dentre os 29,19% de ácidos graxos insaturados, destaca-se a presença de 18,78% de ácido linoleico (C18:2), também reconhecido como ômega- 6.

Por outro lado, quando se cultivou a microalga sob iluminação de cor branca, obteve-se 85,77 % de ácidos graxos saturados, dentre os quais, 59,49 % na forma de ácido palmítico (C16:0) e apenas 0,97% de ácido esteárico (C18:0), enquanto que nos 14,23% dos ácidos graxos insaturados restantes há predominância de ácido linoleico (C18:2) com 11,26 % em relação ao total.

Em contrapartida, quando se cultivou a microalga sob iluminação vermelha, ocorreu predominância de ácidos graxos saturados (86,32%), sendo o ácido palmítico (C16:0), com

57,28 %, presente em maior proporção, enquanto que dentre os ácidos insaturados (13,68 %), constitui-se em maior proporção o ácido palmitoléico (C16:1).

Tabela 5.28 - Composição dos ácidos graxos (% m/m) presentes nos extratos lipídicos da *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator integrado sob as iluminações azul, branco e vermelho.

ácido graxo	Azul	Branco	vermelho
C12:00			6,77
C14:0			6,08
C15:0	6,72	8,51	16,19
C16:0	**46,51**	**59,49**	**57,28**
C16:1	3,43		11,33
C17:0	7,59	16,80	
C18:0	3,99	0,97	
C18:1	6,98	2,97	1,77
C18:2	**18,78**	**11,26**	**0,58**
C20:0	6,00		
mono insaturado	10,41	2,97	13,10
poli insaturado	18,78	11,26	0,58
saturado	70,81	85,77	86,32

Fonte: Autoria própria.

De acordo com Talebi et al. (2013), a qualidade do biodiesel é fortemente dependente da relação entre as proporções de ácidos graxos saturados e insaturados, sendo que o primeiro grupo apresenta boa resistência à degradação, conferindo ao biodiesel um aumento de sua longevidade e resistência à oxidação, enquanto que o segundo grupo (insaturados) confere melhores características de fluidez a frio, indicando desse modo que as condições climáticas determinarão fortemente a aplicabilidade do biodiesel usado.

Segundo Knothe (2005), altas proporções de ácido palmítico no material lipídico relacionam-se a boa qualidade na ignição por exemplo, indicada pelo parâmetro "Número de Cetano (CN)", pois sua forma saturada é bem mais estável do que sua forma insaturada. Ácidos graxos insaturados como o ácido linoleico (C18:3), não detectado nos óleos obtidos neste trabalho, é instável a elevadas temperaturas, levando a polimerização e formação de depósitos que dificultam o processo de ignição. Não obstante, o padrão europeu recomenda óleos com teores menores que 12% de ácido linoleico para atender a especificação dessa propriedade.

Nesse sentido, foi possível verificar as propriedades estimadas do biodiesel proveniente dos óleos extraídas da biomassa oriunda dos cultivos iluminado com as cores azul, branco e vermelho, com base no perfil dos ácidos graxos presentes nos óleos da microalga *Chlorella minutissima* utilizado neste trabalho, em comparação com os resultados obtidos por Loures et al. (2018), conforme apresentado na Tabela 5.29. A estimativa foi realizada conforme descrito no item 4.8.5.

Tabela 5.29 - Propriedades estimadas para o biodiesel com base nos perfis dos ácidos graxos da biomassa de *Chlorella minutissima* sob diferentes cores de iluminação do cultivo.

	Presente estudo			**LOURES et al. (2018)**	**ANP (2014)**
	Azul	**Branco**	**Vermelho**	**Lâmpadas fluorescentes**	**especificação**
Grau de insaturação	47,97	25,49	14,26	33,4	
Número de cetano	63,81	66,54	67,32	65,5	> 50
Ponto de entupimento a frio ˚C	4,42	3,72	1,52	24,2	< 5
Densidade- gcm^3	0,82	0,87	0,87		0,85 a 0,9

Fonte: Autoria própria.

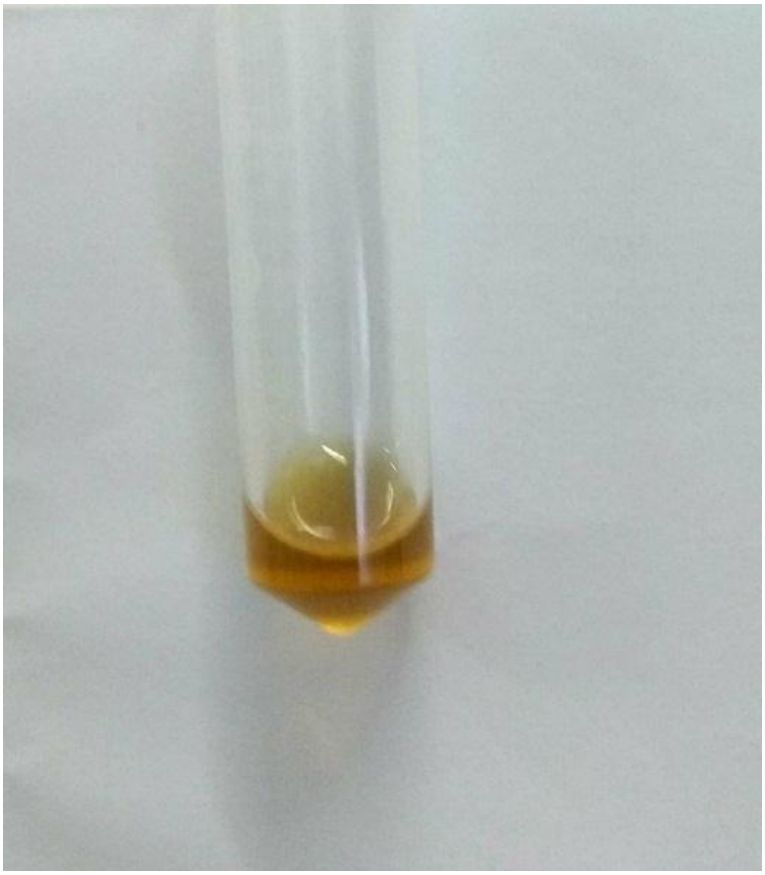
Notou-se que a estimativa das propriedades realizadas atende o especificado pela ANP, sendo que a iluminação influenciou distintamente alguns parâmetros como grau de insaturação e ponto de entupimento a frio, tanto em relação às cores testadas no presente estudo como em comparação com os resultados relatados por Loures et al. (2018), que empregaram lâmpadas fluorescentes no cultivo da *Chlorella minutissima*. Porém, alguns parâmetros, como o número de cetano e a densidade praticamente não foram afetados pela iluminação, muito provavelmente pela semelhança do perfil de ácidos graxos apresentados, mesmo com iluminações de cores diferentes, pois as maiores porcentagens referem-se aos mesmos tipos de ácidos graxos.

Desta forma, diante dos resultados obtidos com o perfil dos ácidos graxos, que serviram de base para estimar as propriedades do biodiesel deste derivado, pode-se considerar que tanto a espécie utilizada neste trabalho, como as cores das iluminações estudas, são adequados à formação de biomassa visando a produção de biodiesel.

5.4 Síntese do biodiesel

A partir do extrato lipídico da biomassa obtida com o experimento confirmatório, conduziu-se a reação de síntese dos ésteres etílicos que resultou em 96,6 % de teor de ésteres, 2,8% de monoacilgliceróis e 0,6% de diacilgliceróis. A Figura 5.38 apresenta o produto da reação de síntese.

Figura 5.38 – Biodiesel obtido via catalise ácida a partir do estrato lipídico de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator proposto.



Fonte: Autoria própria.

O resultado é comparável ao obtido por Loures et al. (2018) utilizando óleo da *Chlorella minutissima*, que testaram dois catalisadores, homogêneo (H_2SO_4) alcançando 96,5 % de conversão, e heterogêneo (Nb_2O_5/SO_2) atingindo 98% de conversão, e superior ao obtido por Pedro (2017), que alcançou 91,6% de conversão utilizando óleo extraído de *Chlorella minutissima* via catálise ácida (H_2SO_4).

Cabe destacar que, a especificação nacional (ANP, 2014), determina um teor mínimo de ésteres de 96,5%, indicando que a reação de síntese do biodiesel foi conduzida adequadamente no presente trabalho.

5.5 Teste comparativo

Considerando que a espécie da microalga e a iluminação definida para o fotobiorreator são adequados à formação de biomassa para a produção de biodiesel (conforme resultados de análises de perfis de ácidos graxos e reação de síntese de biodiesel apresentados nos itens 5.3 e 5.4), foi avaliada a performance do fotobiorreator integrado proposto no presente trabalho, em termos de concentração celular e velocidade específica de crescimento, em comparação com cada uma das configurações que o compõem (coluna de bolhas e tubular).

Todos os experimentos foram realizados sob iluminação interna de cor azul, fotoperíodo de 24h claro: 0h escuro, 0,5 vvm, 5,1 $L.min^{-1}$, conforme melhor ajuste proposto pela análise estatística do planejamento de Taguchi, com concentração inicial de $6{,}2x10^5$ células microalgais por mL de cultivo, a 27±1°C (temperatura da sala) em meio Guillard (Guillard, 1975).

A Figura 5.39 apresenta o sistema experimental montado com os fotobiorreatores (integrado, coluna de bolhas e tubular), todos com iluminação azul interna, para avaliar o desempenho em termos de velocidade específica de crescimento. Atentar para o isolamento luminoso preparado para o fotobiorreator tubular pelo cobrimento da parte cilíndrica com tecido de cortina do tipo "blackout", garantindo que apenas a porção "tubular" disponha de luminosidade, enquanto que a parte cilíndrica (coluna) permanece sem iluminação

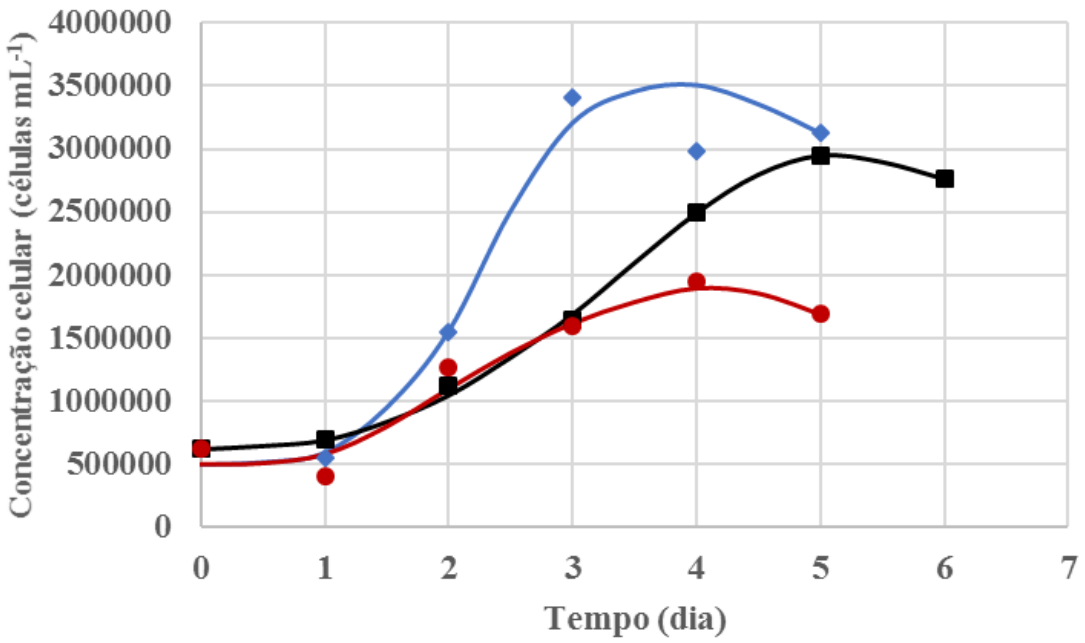
Figura 5.39 - Imagem do Fotobiorreator integrado proposto (A); Coluna de bolhas (B) e Tubular (C), iluminados internamente com a cor azul, para o cultivo de *Chlorella minutissima*, durante o teste comparativo.

Fonte: Autoria própria.

No fotobiorreator coluna de bolhas a microalga se desenvolveu durante 5 dias até alcançar a máxima concentração celular de 2,9x10^6 células/mL (Figura 5.40), resultando uma máxima velocidade específica de crescimento de 0,47 d^{-1} (Figura 5.41). Os cultivos conduzidos nos fotobiorreatores integrado e tubular apresentaram 1 dia de adaptação cada, relativo à recirculação impostas às microalgas através da bomba centrífuga utilizada para movimentar o meio de cultivo pelo sistema. Com isso, o fotobiorreator integrado alcançou 3,4x10^6 células/mL em 3 dias de cultivo (Figura 5.40), atingindo a velocidade máxima de crescimento de 0,90 d^{-1} (Figura 5.41), enquanto que no fotobiorreator tubular a máxima concentração celular de 1,9x10^6 células/mL foi atingida com 4 dias de cultivo (Figura 5.40), levando a 0,61 d^{-1} de máxima velocidade específica de crescimento (Figura 5.41).

A Figura 5.40 apresenta a concentração celular em função do tempo da microalga *Chlorella minutissima* em função do tempo, para os fotobiorreatores integrado, coluna de bolhas e tubular, durante ensaio comparativo de desempenho.

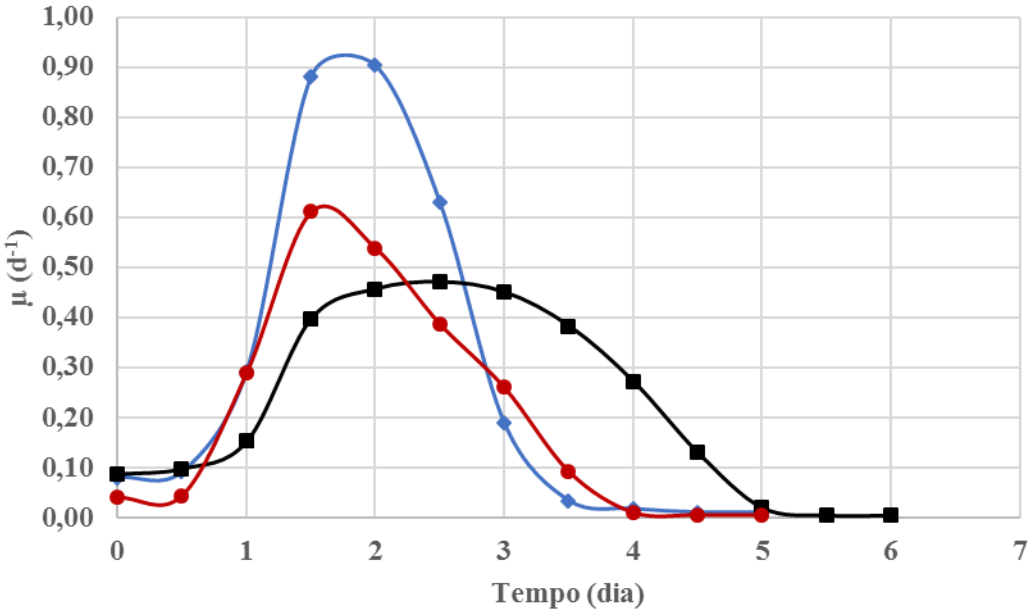
Figura 5.40 - Concentração celular de *Chlorella minutissima* em função do tempo, para os fotobiorreatores integrado (A -♦-); coluna de bolhas (B -■-) e tubular (C -●-).



Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.41 apresenta a velocidade específica de crescimento em função do tempo da microalga *Chlorella minutissima* em função do tempo, para os fotobiorreatores integrado, coluna de bolhas e tubular, durante ensaio comparativo de desempenho.

Figura 5.41 - Concentração celular de *Chlorella minutissima* em função do tempo, para os fotobiorreatores integrado (A -♦-); coluna de bolhas (B -■-) e tubular (C -●-).



Fonte: Autoria própria.

Segundo relatos de Huang et al. (2016), a microalga *Chlorella pyrenoidosa*, cultivada em fotobiorreator tipo *airlift* externamente iluminado alcançou velocidade específica de crescimento de 0,24 d^{-1}. A microalga *Chlorella vulgaris* atingiu 0,54 d^{-1} de velocidade específica de crescimento ao ser cultivada em frascos de laboratório (HEIDARI:KARIMINIA:SHAVEGAN, 2016).

Cultivos fotoautotróficos da microalga *Chlorella sorokiniana* realizados em fotobiorreatores *airlift* e coluna de bolhas atingiram 0,49 d^{-1} e 0,4 d^{-1}, respectivamente (KUMAR, DAS, 2012). De acordo com Aleya et al. (2011), foram obtidas velocidades específicas de crescimento para a microalga *Chlorella minutissima* que variaram de 0,12 a 0,66 d^{-1}, em fotobiorreator do tipo "câmara". A microalga *Chlorella* sp., quando cultivada em frascos de laboratório, atingiu 0,36 d^{-1} de velocidade específica de crescimento (ZHU et al., 2017).

A Tabela 5.30 apresenta os resultados de velocidade específica de crescimento obtidos por diversos autores utilizando diferentes espécies de microalgas do gênero *Chlorella*, cultivadas em vários tipos de fotobiorreatores em comparação aos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 5.30 - Velocidade específica de crescimento de diversas espécies de microalga do gênero *Chlorella.*

Espécie	Fotobiorreator	μ (d^{-1})	Referência
Chlorella pyrenoidosa	*airlift*	0,24	Huang et al. (2016)
Chlorella vulgaris	frascos de laboratório	0,54	Heidari, Kariminia, Shavegan (2016)
Chlorella sorokiniana	*airlift*	0,49	Kumar, Das (2012)
	coluna de bolhas	0,40	
Chlorella minutissima	câmara	0,12 - 0,66	Aleya et al. (2016)
Chlorella sp	frascos de laboratório	0,36	Zhu et al. (2017)
Chlorella minutissima	**tubular**	**0,61**	**Presente trabalho**
	coluna de bolhas	**0,47**	
	integrado	**0,90**	

Fonte: Autoria própria.

Os resultados indicaram que a vantagem do fotobiorreator proposto em comparação com o coluna de bolhas e o tubular se deve a uma melhor disponibilidade de energia luminosa, fornecida pela iluminação interna, principalmente na parte que se configura como tubular, na qual todo o meio de cultivo se aproxima ao máximo da iluminação durante a recirculação por essa configuração, embora tenha sido observado o pior desempenho em termos de concentração de biomassa, nessa configuração isolada.

Tal fato é coerentemente justificado pelo fato de que o fotobiorreator tubular testado neste experimento apresenta pouco tempo de exposição à luz em relação a um longo tempo sem luz (quando atinge o compartimento cilíndrico protegido da luz), prejudicando o crescimento celular.

Em contrapartida, o fotobiorreator integrado fornece iluminação interna para as duas configurações (coluna de bolhas e tubular), garantindo boa disponibilidade de luz desde o início do cultivo, marcado por baixas densidades celulares, e ampla distribuição luminosa dentro do fotobiooreator, até se atingir altas densidades celulares ao longo do processo, que dificulta a penetrabilidade de luz dentro da configuração coluna de bolhas, mas compensado pela configuração tubular do fotobiorreator integrado, que aproxima as células da fonte luminosa durante a recirculação do cultivo. .

Diante desses resultados, pode-se considerar aplicável e promissor o fotobiorreator integrado proposto neste trabalho, para o cultivo de microalgas com potencial para a produção de biodiesel.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com este trabalho é possível concluir que o fotobiorreator integrado proposto, pode ser aplicado para o cultivo de microalgas visando a formação de biomassa com vistas a produção de biodiesel, uma vez que, mesmo conduzindo cultivos fotoautotróficos, em meio de cultivo com pouca oferta de nutrientes, atingiu-se concentração de biomassa (506 mg L^{-1}) com teor lipídico (20,2%) comparáveis ao relatado na literatura, comprovando que o projeto de combinar duas configurações distintas de fotobiorreatores já consagrados (coluna de bolhas e tubular) é promissor para futuros aperfeiçoamentos, pois no teste comparativo, a microalga *Chlorella minutissima* apresentou o maior resultado em velocidade específica de crescimento (0,9 d^{-1}) no fotobiorreator integrado.

Somando-se a isso, a estratégia de submeter parte do período de cultivo da microalga à privação parcial de nitrato, também foi bem sucedida quanto ao acúmulo de lipídeos na biomassa (120,77% entre as fases), que aliada ao planejamento experimental de Taguchi, permitiu ajustar, segundo a análise estatística, as condições operacionais de cor da iluminação (azul), fotoperíodo (24 h claro: 0 h escuro), aeração (0,5 vvm) e vazão de recirculação de meio de cultivo (5,1 L min^{-1}) que resultou nos resultados mais elevados de concentração de biomassa (fase 1 e 2), produtividade volumétrica de biomassa (fase 1 e 2), teor de lipídeos (fase 2) e produtividade de lipídeos (fase 1 e 2).

O perfil de ácidos graxos do extrato lipídico de *Chlorella minutissima* cultivada no fotobiorreator apresentou-se adequado à síntese de biodiesel, independentemente da cor da iluminação testada neste trabalho. O emprego dos lipídeos obtidos com o cultivo conduzido sob o ajuste proposto pela análise estatística, resultou em 96,6% de conversão em biodiesel via catálise ácida.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos experimentos realizados e nos resultados obtidos no cultivo da microalga *Chlorella minutissima,* utilizando o fotobiorreator integrado proposto sugere-se os seguintes estudos para trabalhos futuros:

- Avaliar a influência dos mesmos fatores testados no presente trabalho quanto ao acúmulo de outros produtos, como por exemplo carboidratos, proteínas e pigmentos;

- Promover cultivos abastecidos com CO_2 gasoso ou outra fonte de carbono (orgânico ou inorgânico) configurando um regime mixotrófico para promover maior produção de biomassa durante a fase 1, e avaliar o efeito de cada fonte de carbono no cultivo;

- Alterar a cor da iluminação entre as fases 1 e 2, como por exemplo testar a luz azul na fase 1 e a luz vermelha na fase 2;

- Promover cultivos com combinações luminosas, utilizando-se simultaneamente iluminação branco-azul na fase 1 e azul-vermelha na fase 2, bem como outras combinações;

- Iluminar cada configuração do fotobiorreator com uma cor, por exemplo, a configuração coluna de bolhas com a luz azul, e a configuração tubular com a luz vermelha e/ou o contrário;

- Utilizar outras espécies de microalgas para serem cultivadas no fotobiorreator integrado;

- Substituir o meio de cultivo sintético por algum efluente líquido rico em nutrientes como carbonatos, nitrato e fosfato.

- Realizar análises dos perfis de ácidos graxos dos lipídeos já obtidos com cada condição experimental para as fases 1 e 2 e avaliar a influência dos fatores estudados na composição dos ácidos graxos.

- Testar catalisadores heterogêneos para a síntese de biodiesel com os lipídeos obtidos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, M. S. R.; BRAIN, C. M.; HARVEY, A. P.; MORRISON, M. I.; PEREZ, G. V., Liquid culture of microalgae in a photobioreactor (PBR) based on oscillatory baffled reactor (OBR) technology - A feasibility study, **Chemical Engineering Science**, v.138, p.315-323, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - **ANP** - Anuário estastístico brasileiro de petróleo, gás natural e biocombustivel. Disponível em:<*http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017*>. Acesso em: 09 jan. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - **ANP**. Resolução n. 45 De 25/08/2014. Dispõe sobre a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3 de 2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 ago. 2014. Seção 1. Disponível m:<http://www.legisweb.com.br>. Acesso em: 30 abr. 2018.

AHMAD, A.L., N.H. MAT YASIN, C.J.C. DEREK, J.K. LIM. Microalgae as a Sustainable Energy Source for Biodiesel Production: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.15, p. 584–93. 2011.

AL HATTAB, M., GHALY A., PÉREZ DE LOS RÍOS, A. 2015. Production of Biodiesel from Marine and Freshwater Microalgae: A Review. **Advances in Research Italy** v. 24, p. 107–55. 2015.

ALEYA L., DAUTA, A., COLIN S., REYNOLDS, Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. **European Journal of Protistology** v. 47, p. 239–244, 2011.

ALMEIDA, C. C. Sistema Eletrônico baseado em diodos emissores de luz (LEDs) para aplicação em estudos de Fisiologia Vegetal. 2014, 88p. Dessertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Faculdade de Engenharia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

AMARAL M. S., LOURES C.C., DA RÓS P.C.M., MACHADO S.A., REIS C.E.R., de CASTRO H.F., SILVA M.B. Evaluation of the cultivation conditions of marine microalgae Chlorella sp. to be used as feedstock in the ethanolsis assisted by ultrasound. **Biofuel Research Journal** , v.7 ,p 288-294, 2015.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v.88, p.3402-3410, 2011.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Champaing: AOCS, 2004.

ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F., *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of

ethyl esters based on babassu oil, **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 37, p.2539-2548, 2014.

ANDRULEVICIUTE, V., MAKAREVICIENE, V. SKORUPSKAITE, V., GUMBYTE, M.. Biomass and Oil Content of Chlorella Sp., Haematococcus Sp., Nannochloris Sp. and Scenedesmus Sp. under Mixotrophic Growth Conditions in the Presence of Technical Glycerol. **Journal of Applied Phycology** v. 26, p. 83–90. 2014.

ARORA, N.; PATEL, A.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V., Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production, **Bioresource Technology**, v.213, p.79-87, 2016.

ATTA, MADIHA, ANI IDRIS, ATAULLAH BUKHARI, AND SUZANA WAHIDIN. Intensity of Blue LED Light: A Potential Stimulus for Biomass and Lipid Content in Fresh Water Microalgae Chlorella Vulgaris. **Bioresource Technology** v. 148, 373–78. 2013.

AVILA-LEON-LEON, I.A. Estudo da produção de biomassa e lipídeos no cultivo de Neochloris oleoabundans sob diferentes condições de estresse nutricional e físico. 2014, 107p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

BARROS, ANA I., ANA L. GONÇALVES, MANUEL SIMÕES, AND JOSÉ C.M. PIRES. Harvesting Techniques Applied to Microalgae: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 41, p. 1489–1500. 2015.

BECKER, E.W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press. New York. 1994.

BELBUTE, JOSÉ M., AND ALFREDO M. PEREIRA. An Alternative Reference Scenario for Global CO2 Emissions from Fuel Consumption: An ARFIMA Approach. **Economics Letters** v. 136, p. 108–11. 2015.

BHATNAGAR, A.; S. CHINNASAMY; M. SINGH; K. C. DAS. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy,** 88**,** 3425-3431. 2011

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 389–395, 1959

BRENNAN, L., OWENDE, P.. Biofuels from microalgae—A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 14, p. 557–77, 2010.

BRINDLEY, C., JIMÉNEZ-RUÍZ, N., ACÍENS, J. M., FERNÁNDEZ-SEVILLA, Light regime optmization in photobioreactors using a dynamics photosynthesis model, **Algal Research**, v.16, p. 399-408, 2016.

CAO, J.; YUAN, H.L.; LI, B.Z.; YANG, J.S., Significance evaluation of the effects of environmental factors on the lipid accumulation of Chlorella minutissima UTEX 2341

under low-nutrition heterotrophic condition, **Bioresource Technology**, v.152, p.177-184, 2014.

CARVALHO JÚNIOR, Rui Miguel de. **Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise *in situ*.** 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

CARVALHO J. C. M.,. MATSUDO, M. C.,. BEZERRA, R. P., FERREIRA-CAMARGO, L. S., SATO, S., R. Bajpai et al. (eds.), ***Algal Biorefineries***. New York: Springer. 2014.

CHAKRABORTY, S.; MOHANTY, D.; GHOSH, S.; DAS, D., Improvement of lipid content of *Chlorella minutissima* MCC 5 for biodiesel production, **Journal of Bioscience and Bioenineering**, v. 122, p.294-300, 2016.

CHEN, CHUN-YEN, KUEI-LING YEH, HSIN-YUEH CHANG, JO-SHU CHANG. Strategies to Improve Oil/Lipid Production of Microalgae in Outdoor Cultivation Using Vertical Tubular-Type Photobioreactors. **Energy Procedia** v. 61, p. 2755–58. 2014.

CHENG, JUN, ZONGBO YANG, QING YE, JUNHU ZHOU, KEFA CEN. Improving CO2 Fixation with Microalgae by Bubble Breakage in Raceway Ponds with up-down Chute Baffles. **Bioresource Technology** v.201, p. 174–81. 2016.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances,** v. 25, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v.26, p.126-131, 2008.

CHISTI, Y.. Microalgae: Our Marine Forests. **Biotechnology Advances** v. 22, p.565–66. 2004.

DA RÓS, P. Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica. 2012, p. 175, Tese (Doutorado em Ciências) - Escola deEngenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

DA RÓS, P. et al. Microbial oil derived from filamentous cyanobacterium trichormus sp. as feedstock to yield fatty acid ethyl esters by enzymatic synthesis. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1–14, 2017.

DEMIRBAS, A. Use of Algae as Biofuel Sources. **Energy Conversion and Management** v. 51. p. 2738–49. 2010.

DOGARIS, I.;WELCH, M.;MEISER, A.; WALMSLEY, L.;PHILIPPIDIS, G., A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae, **Bioresource Technology**, v.198, p.316-324, 2015.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, mar. 2010.

EL-SHEEKH, MOSTAFA M., HANAN M. KHAIRY, SALY F. GHEDA, AND RANIA A. EL-SHENODY. Application of Plackett–Burman Design for the High Production of

Some Valuable Metabolites in Marine Alga Nannochloropsis Oculata. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 2015.

FUENTE, D.; KELLER, J.; CONEJERO, J. A.; ROGNER, M.; REXROTH, S.; URCHUEGUÍA, J. R., Light distribution and spectral composition within cultures of micro-algae: Quantitaive modelling of the light field in photobioreactors, **Algal Research**, v.23, p.166-177, 2017.

GO, A. W. et al. Developments in in-situ (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.60, p. 284–305, 2016

GOMBERT, A. K. Cinética de Processos Fermentativos - Apêndice. In: Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W. Coordenadores. Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica, vol. 2, São Paulo, Edgard Blücher, p. 93-122, 2001

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Eds.). **Culture of marine invertebrate animals.** New York: Plenum. p. 29-60, 1957.

HARUN, R., SINGH, M., GARETH, M. FORDE, DANQUAH, M. K. Bioprocess Engineering of Microalgae to Produce a Variety of Consumer Products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 14, p. 1037–47. 2010.

HECK, V.;GERTEN, D.; WOLFGANG, POPP, A. Biomass-based negative emissions difficult to reconcile with planetary boundaries, **Nature Climate Change**, v.10, p105007, 2018.

HEIDARI, M.;KARIMINIA, H. R.; SHAYEGAN, J. Effect of culture age and initial inoculum size on lipid accumulation and productivity in a hybrid cultivation system of Chlorella vulgaris. **Process Safety and Environmental Protection**, v.104, p.111-122, 2016.

HEREDIA-ARROYO, TAMARYS, WEI W., RUAN, R., BO HU. Mixotrophic Cultivation of Chlorella Vulgaris and Its Potential Application for the Oil Accumulation from Non-Sugar Materials. **Biomass and Bioenergy** v. 35, p. 2245–53. 2011.

HO, S.-H.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S., Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalgae Scenedesmus obliquus CNW-N, **Bioresource Technology**, v.113, p.244-252, 2012.

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

HUANG, JIANKE, YUANGUANG LI, MINXI WAN, YI YAN, FEI FENG, XIAOXING QU, JUN WANG. Novel Flat-Plate Photobioreactors for Microalgae Cultivation with Special Mixers to Promote Mixing along the Light Gradient. **Bioresource Technology** v. 159, p. 8–16. 2014.

HUANG, J. J.; BUNJAMIN, G.; TEO, E. S.; NG, D. B.; LEE, Y. K., An enclosed rotating floating photobioreactor (RFP) powered by flowing water for mass cultivation of photosynthetic microalgae, **Biotechnology for Biofuels**, v.9, p.218, 2016.

HUANG, Q.; JIANG, F. WANG, L.; YANG, C., Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms, **Engineering**, v.3, p.318-329, 2017.

HULTBERG, MALIN JÖNSSON, HELENE LARSSON BERGSTRAND, KARL JOHAN CARLSSON, ANDERS S. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga Chlorella vulgaris. **Bioresource Technology** v.159, p. 465-467. 2014.

ILUZ, D.; ABU-GHOSH, S., A novel photobioreactor creating fluctuating light from solar energy for a higher light-to-biomass conversion efficiency, **Energy Conversion and Management**, V. 126, p. 767-773, 2016.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - **IEA**, CO2 emissions from fuel combustion *highlights*, IEA, 2017

JACOB-LOPES, E., SCOPARO, C. H. G., LACERDA, L. M. C. F., FRANCO, T. T. Effect of light cycles (night/day) on CO2 fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. **Chemical Engineering and Processsing: Intensification**, v. 48, p. 306 - 310, 2009.

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

KHAN, S. A.; MALLA, F. A.; RASHMI; MALAV, L. C.; GUPTA, N.; KUMAR, A., Potential of wastewater treating *Chlorella minutissima* for methane enrichment and CO2 sequestration of biogas and producing lipids, **Energy**, (in press), 2018.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Processing Technology, v. 86, n. 10, p. 1059–1070, 2005.

KOBAYASHI, N., BARNES, A., JENSEN, T., NOEL, E., ANDLAY, G., BETENBAUGH, R., M. J. GUARNIERI, M. T., OLYER, G. A., Comparison of biomass and lipid production under ambient carbon dioxide vigorous aeration and 3% carbon dioxide condition among the lead candidate *Chlorella* strains screened by varius photobioreactors scales, **Bioresource Technology**, v.198, p. 246-255, 2015.

KUMAR, K. D., DAS, C. N. D. Cell growth kinetics of Chlorella sorokiniana and nutritional values of its biomass, **Bioresource Technology**, v.167, p.358-366, 2014.

LEE, E.; JALALIZADEH, M.; ZHANG, Q., Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review, **Algal Research**, v.12, p.497-512, 2015.

LEMÕES, J. S. Síntese de Ésteres Graxos de Chlorella sp . utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação in situ. 2011. Dissertação (Mestrado em

Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2011.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. Appl Energ, v.87, p. 1083-1095, 2010.

LI, Z.S.; YUAN, H.L.; YANG, J.S.; LI, B.Z., Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341, **Bioresource technology**, v.102, p.9128-9134, 2011.

LIAO, Q.;LI, L.; CHEN, R.; ZHU, X. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. Bioresource Technology, V.161, p.186-191, 2014.

LÓPEZ-ROSALES, L, F GARCÍA-CAMACHO, A SÁNCHEZ-MIRÓN, A CONTRERAS-GÓMEZ, MOLINA-GRIMA. An Optimisation Approach for Culturing Shear-Sensitive Dinoflagellate Microalgae in Bench-Scale Bubble Column Photobioreactors. **Bioresource Technology** v. 197, p. 375–82. 2015.

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

LOURES, C. A.; AMARAL, M. S.; DA RÓS, P. C. M.; ZORN, S. M. F. E.; CASTRO, H. F. C.; SILVA, M. B. Simultaneous esterification and transesterification of microbial oil from Chlorella minutissima by acid catalysis route: A comparison between homogeneous and heterogeneous catalysts, **Fuel**, v.211, p.261-268, 2018.

LV, JIAN-MING, LI-HUA CHENG, XIN-HUA XU, LIN ZHANG, AND HUAN-LIN CHEN. Enhanced Lipid Production of Chlorella Vulgaris by Adjustment of Cultivation Conditions. **Bioresource Technology** v.101, p. 6797–6804. 2010.

MATA, TERESA M, MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 14, p. 217–32. 2010.

MENDES, C. E.; BADINO, A. C., Hydrodynamics of Newtonian and non-Newtonian liquids in internal-loop airlift reactors, **Biochemical Engineering Journa**l, v.109, p.137-152, 2016.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technol**, v.97, p. 841-846, 2006.

MOHSENPOUR, S. F.; RICHARDS, B.; WILLOUGHBY, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production, **Bioresource Technology,** v.125, p.75-81, 2012.

NEJAT, PAYAM, FATEMEH JOMEHZADEH, MOHAMMAD MAHDI TAHERI, MOHAMMAD GOHARI, AND MUHD ZAIMI ABD. MAJID. A Global Review of Energy Consumption, CO2 Emissions and Policy in the Residential Sector (with an Overview of the Top Ten CO_2 Emitting Countries). **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 43, p. 843–62. 2015.

OKUMURA, C., SAFFREENA N., RAHMAN, A., HASEGAWA, H., MIKI, O., TAKIMOTO, A. Economic Efficiency of Different Light Wavwlengths and Intensities Using LEDs for the Cultivation of Green Microalgae *Botryococcus braunii* (NIES-836) for Biofuel Productio. **Environmental Progress & Sustentainable Energy**, v34, 2014.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; AREMU, A. O.; OKEM, A.; LOVÁSZ, Z. M.; STADEN, J. V., Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains, **Algal Research**, v.16, p.141-149, 2016.

PAIVA, E.J.M.; SILVA, M.L.C.P.; BARBOZA, J.C.S.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; Giordani, D.S. Nonedible babassu oil as a new source for energy production – a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound. **Ultrason Sonochem**, v.20, p833 ,2013

PAZOS, J.V.P.; IZQUIERDO, P.F. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. **Cien.Tecnol. Fut**. .v4, p.47–58, 2011.

PEDRO, G. A. **Síntese de ésteres etílicos de ácido graxos por transesterificação direta de biomassa de microalga marinha *Chlorella minutissima***. 2017. 134p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

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

PERRIER, B., CRAMPON, C., GUÉZET, O., SIMON, C., MAIRE, F., LÉPINE, O. PRUVOST,J., LOZANO, P., BERNARD, O., BADENS, E. Production of a Methyl Ester from the Microalgae Nannochloropsis Grown in Raceways on the French West Coast. **Fuel** v. 153, p. 640–49. 2015.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: An overview. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, n. 6, p.1313-1330, 2005.

PRUVOST, J.; GOUIC, B. L.; LEPINE, O.; LEGRAND, J.; BORGNE, L., Microalgae culture in building-integrated photobioreactors: Biomass production modelling and energetic analysis, **Chemical Engineering Journal**, v.284, p.850-861, 2016.

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

RASTOGI, R. P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C.; MADAMWAR, D., Algal Green Energy - R & D and technological perspectives for biodiesel production, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.82, p.2946-2969, 2018.

REIBER, WERNER. Algae—Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, London, (2006). **Journal of Plant Physiology**. 2007.
RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture:** biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004.

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

SÁNCHEZ MIRÓN, ASTERIO, GARCÍA, M. C. C., CAMACHO, F. G., EMILIO GRIMA, M., CHISTI, Y. Growth and Biochemical Characterization of Microalgal Biomass Produced in Bubble Column and Airlift Photobioreactors: Studies in Fed-Batch Culture. **Enzyme and Microbial Technology** v. 31, p. 1015–23. 2002.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F., Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine, **Saudi Journal of Biological Sciences**, (in press), 2017.

SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S., Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production, **Trends in Biotechnology**, v.32, p.442-430, 2014.

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

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O.. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, v. 27**,** p. 409-416, 2009.

SINGH, R. N.; SHARMA, S., Development of suitable photobioreactor for algae production - A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p.2347-2353, 2012.

SOLIMENO, A.; ACÍEN, F. G.; GARCÍA, J., Mechanistic model for design, analysis, operation and control of microalgae cultures: Calibration and application to tubular photobioreactors, **Algal Research**, v.21, p.236-246, 2017.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 101, p. 87–96. 2006.

STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; MARÓTI, G.; LJUNG, K.; TURECKOVÁ, V.; STRNAD, M.; ORDOG, V.; STADEN, J. V., Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae), **Plant Physiology and Biochemistry**, v.79, p.66-76, 2014.

TA, C.H.; KANG, C.H.; JUNG, J.H, JEONG, G.T.; KIM, S.K., Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae, **Bioresource Technology**, v.212, p.254-261, 2016.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y., BiodieselAnalyzer©: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel, **Biofuel Research Journal,** v.2, p.55-57, 2014.

TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TAN, X. B.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; WONG, C. Y.; LEE, K. T., Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing, **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.26, p.17-30, 2018.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-products: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 1179–1198, 2016.

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; GUMBYTE, M. Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae : a review. **Fuel Processing Technology**, v. 150, p. 78–87, 2016

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

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F.C.; DE CASTRO, H. F., Synthesis of chromatographic standards and establishment of a method for the quantification of the fatty ester composition of biodiesel from babassu oil. **Quimica Nova,** v.31, p.407–412, 2008.

VALDÉS, F. J., M. R. HERNÁNDEZ, L. CATALÁ, AND A. MARCILLA. Estimation of CO 2 stripping/CO 2 Microalgae Consumption Ratios in a Bubble Column Photobioreactor Using the Analysis of the pH Profiles. Application to Nannochloropsis Oculata Microalgae Culture. **Bioresource Technology** v. 119,p. 1–6. 2012.

VIEIRA, A.P. et al. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, v.36, p.283-288, 2006.

XIN, L., HONG-YING, H., KE, G., YING-XUE, S.,. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp. Bioresour. Technol. v.101, p.5494–5500. 2010.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M., Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses, **Biotechnology Advances**, v.30, p.904-912, 2012.

YADAV, G.; SEM, R., Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological advances in climate research, **Journal of CO2 Utilization**, v.17, p.188-206, 2017.

YAM, F.K., AND Z. HASSAN. Innovative Advances in LED Technology. **Microelectronics Journal** v. 36, p. 129–37. 2005.

YAN, C.; LUO, X.; ZHENG, Z., Effects of various LED light qualities and intensity supply strategies on purification of slurry from anaerobic digestion process by *Chlorella vulgaris*, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.79, p.81-87, 2013.

YANG, H. J.; HWANG, P. J.; LEE, S. H. A study on shrinkage compensation of the SLS process by using the taguchi method. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 42, n. 11, p. 1203–1212, 2002.

YANG, J.; CAO, J.; XING, G.; YUAN, H., Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341, **Bioresource Technology**, v.175, p.537-544, 2015.

YEN, H.-W.; CHANG, J.-T., A two-stage cultivation process for growth enhancement of Chlorella vulgaris, **Bioprocess Biosystem Engineering** v.36, p.1797-1801, 2013.

YEONG, T. K.; JIAO, K.; ZENG, X.; LIN, L.; PAN, S.; DANQUAH, M. K., Microalgae for biobutanol production - Technology evaluation and value proposition, **Algal Research**, v.31, p.367 - 376, 2018.

ZHANG, Y.; BAO, K.; WANG, J.; ZHAO, Y.; HU, C., Performance of mixed LED light wavelengths on nutrient removal and biogas upgrading by different microalgal-based treatment technologies, **Energy**, v.130, p.392-401, 2017.

ZHAO, L.-S.; LI, K.; WANG, Q.-M.; SONG, X.-Y.; SU, H.-N.; ZHANG, X.-Y.; HUANG, F.; CHEN, X.-L.; ZHOU, B.-C.; ZHANG, Y.-Z., Nitrogen starvation impacts the photosynthetic performance of *Porphyridium cruentum* as revealed by chlorophyll a fluorescence, **Scientific Reports**, v.7, doi:10.1038/s41598-017-08428-6, 2017.

ZHU, L. Biorefinery as a Promising Approach to Promote Microalgae Industry: An Innovative Framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 41, p. 1376–84. 2015.

ZHU, L., HUO, S., QIN, L. A microalgae-based biodiesel refinery: sustainability concerns and challenges. **Int. J. Green Energy**, v.12, p.595–602, 2015.

ZHU, L. D.; LI, Z. H.; HILTUNEN, E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. **BioMed Research International**, 2016

ZHU, D.-L.; LI, Z.-H.; GUO, D.-B.; HUANG, F.; NUGROHO, Y.; XIA, K. Cultivation of Chlorella sp. with livestock waste compost for lipid production, **Bioresource Technology**, v.223, p.296-300, 2017.