MATEUS DE SOUZA AMARAL

Cultivo da microalga marinha *Chlorella sp.* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP

Fevereiro, 2014

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.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Amaral, Mateus de Souza

Cultivo da microalga marinha *Chlorella sp.* como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel. / Mateus de Souza Amaral. – ed. reimpr. e corr. - 2014.
109 p: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2014.

Orientador: Messias Borges Silva.

1. Microalgas 2. *Chlorella sp.* 3. Lipídeos 4. Biodiesel 5. Planejamento de experimentos. I. Título. II. Silva, Messias Borges, orient.

582.26 – CDU

Dedicatória

*Aos meus pais: Osvaldo e Lúcia,
que apesar da distância,
caminham o tempo todo ao meu lado,
me abrigando a cada tempestade e cuidando dos meus pés
para eu seguir em frente...*

*À minha querida irmã Caroline,
por todo o carinho e amizade demonstrados a vida toda...*

*À minha namorada Ana Paula,
por toda a compreensão, paciência e
pela força e energia de vida que dela à mim irradia,*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Messias Borges Silva, meu orientador, pela oportunidade prestada de desenvolver este trabalho, pela orientação e condução deste projeto. Obrigado pela paciência, conselhos e pela amizade construída.

À Prof^a Dra. Heizir Ferreira de Castro pela parceria prestada, sugestões e contribuições valiosas ao projeto e todo suporte oferecido a fim de garantir uma maior qualidade ao trabalho.

À Prof^a Sônia Maria Flores Giancesella, Flávia Saldanha Corrêa e Fernando Kanemoto do Instituto Oceanográfico da USP pelo auxílio e doação da linhagem da microalga concedida.

À Dra. Patrícia Caroline Molgero da Rós, pela essencial ajuda durante todas as etapas do projeto. Muito obrigado por toda gentileza prestada, paciência, sugestões e conselhos.

À Prof^a. Dra. Larissa de Freitas Teixeira pelas sugestões e contribuições pertinentes ao trabalho.

Aos meus pais, Osvaldo e Lúcia, que são as pessoas mais importantes da minha vida. Muito obrigado pelo amor, carinho, educação e pelo incansável incentivo que me ajudam a realizar meus sonhos.

À minha irmã Caroline, que me contamina sempre com a sua sensibilidade e bom humor.

À minha namorada Ana Paula, cúmplice neste trabalho. Muito obrigado pelo apoio, companheirismo e amor. Com certeza tudo teria sido muito difícil sem a sua presença.

Aos meus amigos do laboratório de Meio Ambiente, Vinícius, Pedro, Cristiano, Felipe, Ivy, Fernanda e Beatriz, pela convivência, ajuda e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biocatálise, Weriton, Ana Karine, Daniel e Ruan pela ajuda e conselhos prestados.

Aos Professores Dr. Luís Fernando Figueiredo Faria, Dr. Domingos Sávio Giordani, Dr. Helcio José Izário Filho, Dr. Ararão Serra e a Prof^a Dra. Jayne Carlos de Souza Barbosa. Agradeço também Paulo Mendes, Sara, Brandão e demais colegas e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

AMARAL, M. S. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella sp.* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2013. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

A necessidade de se encontrar um substituto ao combustível fóssil tem impulsionado o desenvolvimento de novas fontes de biomassa para os biocombustíveis. Atualmente uma fonte de biomassa alternativa que vêm ganhando destaque são as microalgas, micro-organismos fotossintéticos capazes de capturar o CO₂ atmosférico e acumular altos teores de lipídeos em sua biomassa, tornando-os muito atrativos como fonte de matéria-prima para a síntese de biodiesel. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos dos fatores NaNO₃, CO₂, intensidade luminosa e profundidade no cultivo da microalga marinha *Chlorella sp* visando o acúmulo de lipídeos dessa microalga em sua biomassa para a produção de biodiesel. O trabalho foi dividido em três etapas principais: na primeira foram realizados os cultivos nos quais os fatores de interesse foram avaliados em dois níveis de operação, NaNO₃ (0,25 e 0,75 g/l), CO₂ (5 e 10 %), intensidade luminosa (0,85 e 14,5 klux) e profundidade (5 e 10 cm); na segunda etapa foram realizadas as extrações lipídicas da biomassa para a quantificação dos teores lipídicos; e na terceira etapa realizou-se a síntese do biodiesel por via química a partir dos lipídeos extraídos da biomassa. Os experimentos que compreenderam a etapa dos cultivos foram realizados segundo um planejamento de Taguchi L₈, considerando como variáveis respostas concentração de biomassa e teor lipídico. O melhor ajuste para maximizar a concentração de biomassa e teor lipídico foi de 0,85klux de intensidade luminosa, 5% de CO₂, 10 cm de profundidade e 0,42g.L⁻¹ de NaNO₃ que forneceu uma concentração de biomassa de 2,04 g.L⁻¹ com 15,04% de teor lipídico. O perfil lipídico apresentou uma proporção de 60 % entre ácidos graxos saturados, 31,7% entre ácidos monoinsaturados e 8,26 % de ácidos poli-insaturados e a reação de síntese do biodiesel atingiu uma conversão de 78,4%.

Palavras Chave: Microalga, *Chlorella sp.*, Lipídeos, Biodiesel, Planejamento de experimentos

ABSTRACT

AMARAL, M. S. **Cultivation of marine microalga *Chlorella* sp. as feedstock for biodiesel production**. 2013. 109p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

The necessity of finding a substitute to fossil fuel has enhanced the development of new biomass sources for biofuels. Currently, an alternative source of biomass that has acquiring prominence are microalgae, which are photosyntetical microorganisms able to capture the atmospheric CO₂ and accumulate high content of lipids in their biomass, making them a very attractive feedstock source for biodiesel synthesis. In such a way, the present work had the objective of studying the effect of the following factors: NaNO₃, CO₂, luminous intensity and depth in the cultivation of marine microalga *Chlorella* sp, aiming the lipid accumulation of this microalga in its biomass for biodiesel production. The project was divided in three main steps: in the first one, the experiments were performed to evaluate the following factors in two levels of operation, NaNO₃ (0,25 and 0,75 g/l), CO₂ (5 and 10 %), luminous intensity (0,85 and 14,5 klux) and depth (5 and 10 cm); in the second step, the lipid extractions from the biomass were performed to quantify the lipid contents; and in the third one, the synthesis of biodiesel via chemical route was performed utilizing the lipids extracted from the biomass. The experiments regarding the cultivation steps were performed according to a Taguchi L₈ experimental design, considering the biomass concentration and lipid content as response variables. The best fit for maximization of biomass concentration and lipid content was 0,85 klux of luminous intensity, 5% of CO₂, 10 cm of depth and 0,42g/l of NaNO₃, which provided a biomass concentration of 2,04 g/l with 15,04% of lipid content. The lipid profile showed a proportion of 60% of saturated fatty acids, 31,7% of monounsaturated fatty acids and 8,26% of polyunsaturated fatty acids and the reaction of biodiesel synthesis yielded a conversed of 78,4%.

Keywords: Microalgae, *Chlorella* sp., Lipids, Biodiesel, Design of Experiments

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Projeções das emissões de CO ₂ por tipo de combustível	20
Figura 3.2. Percentual representativo das matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil.....	21
Figura 3.3. Processo conceitual para a produção de biocombustível a partir de biomassa microalgal.....	23
Figura 3.4. Variação da biomassa numa cultura em modo batelada	27
Figura 3.5. Desenho esquemático de uma raceway pond.....	30
Figura 3.6. Esquema de fotobiorreator do tipo flat-plate.....	31
Figura 3.7. Esquema de fotobiorreator do tipo coluna.....	32
Figura 3.8. Esquema de fotobiorreator do tipo tubular.....	32
Figura 3.9. Reação de transesterificação	40
Figura 3.10. Esquema de reação de esterificação.....	41
Figura 3.11. Fatores influentes em um processo.....	43
Figura 4.1. Desenho esquemático de um tanque fotossintético e iluminação.....	47
Figura 4.2. Desenho explicativo do fotobiorreator, esquema do sistema de arrefecimento e imagem do detalhe da entrada e saída de água de arrefecimento.....	48
Figura 4.3. Detalhe da tampa adaptada.....	49
Figura 4.4. Esquema do sistema de fotobiorreatores.....	49
Figura 4.5. Imagem do sistema de fotobiorreatores.....	50
Figura 4.6. Identificação da profundidade.....	51
Figura 4.7. A- Desenho esquemático do cepário. B- Imagem dos frascos para manutenção da cepa. C- Imagem do cepário.....	53

Figura 4.8. Esquema adotado para a floculação.....	57
Figura 4.9. Separação das fases polar e apolar.....	59
Figura 4.10. Esquema reacional de síntese do biodiesel.....	59
Figura 4.11. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ¹ H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos (GARCIA, 2006).....	62
Figura 4.12. Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do n+1	63
Figura 4.13. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio do CH ₂ etoxílico dos ésteres etílicos	63
Figura 5.1. Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.....	65
Figura 5.2. Curva de crescimento do fotobiorreator 1 obtida por contagem celular.....	66
Figura 5.3. Curva de crescimento do fotobiorreator 2 obtida por contagem celular.....	66
Figura 5.4. Curva de crescimento do fotobiorreator 3 obtida por contagem celular.....	67
Figura 5.5. Curva que relaciona absorbância e contagem celular.....	68
Figura 5.6. Curva de crescimento microalgal para o experimento 1.....	70
Figura 5.7. Curva de crescimento microalgal para o experimento 2.....	70
Figura 5.8. Curva de crescimento microalgal para o experimento 3.....	71
Figura 5.9. Curva de crescimento microalgal para o experimento 4.....	71
Figura 5.10. Curva de crescimento microalgal para o experimento 5.....	72
Figura 5.11. Curva de crescimento microalgal para o experimento 6.....	72
Figura 5.12. Curva de crescimento microalgal para o experimento 7.....	73
Figura 5.13. Curva de crescimento microalgal para o experimento 8.....	73

Figura 5.14. Influência dos fatores sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal.....	75
Figura 5.15. Influência das interações entre os fatores sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal.....	76
Figura 5.16. Influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído da concentração de biomassa microalgal.....	77
Figura 5.17. Influência das interações entre os fatores sobre o sinal ruído para a concentração da biomassa.....	78
Figura 5.18. Influência dos fatores sobre a variável resposta produtividade em massa da biomassa microalgal.....	81
Figura 5.19. Influência das interações entre os fatores sobre a variável resposta produtividade em massa da biomassa microalgal.....	82
Figura 5.20. Influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído da produtividade em massa microalgal.....	83
Figura 5.21. Influência das interações entre os fatores sobre o sinal ruído para a produtividade em massa da biomassa.....	84
Figura 5.22. Influência dos fatores sobre a variável resposta teor de lipídeos.....	86
Figura 5.23. Influência das interações dos fatores sobre a variável resposta teor de lipídeos.....	87
Figura 5.24. Influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído do teor de lipídeos Influência dos fatores sobre a variável resposta teor de lipídeos.....	88
Figura 5.25. Influência das interações dos fatores sobre o sinal ruído no acúmulo de lipídeos.....	89
Figura 5.26. Ajuste desejado fornecido pelo programa MINITAB versão 16.0. Codificação: Nível baixo (-1,0), Nível alto (1,0).....	92
Figura 5.27. Composição dos ácidos graxos presentes no material lipídico.....	95

Figura 5.28. Ressonância magnética nuclear do biodiesel da microalga <i>Chlorella</i> <i>sp.</i>	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Produtividade em biodiesel de diferentes matérias-primas.....	22
Tabela 3.2. Espécies produtoras de lipídeos e suas respectivas porcentagens em relação a massa seca.....	35
Tabela 3.3. Vantagens e desvantagens quanto ao tipo de catalisador.....	41
Tabela 3.4. Processos de síntese de biodiesel da microalga <i>Chlorella</i>	41
Tabela 4.1. Reagentes utilizados para a preparação do meio de cultivo.....	46
Tabela 4.2. Intensidade luminosa fornecida pelas lâmpadas.....	54
Tabela 4.3. Fatores de operação dos experimentos e codificação dos níveis.....	55
Tabela 4.4. Arranjo Ortogonal de Taguchi L8.....	56
Tabela 4.5. Concentração celular inicial.....	56
Tabela 4.6. Condição experimental utilizada na determinação da concentração celular inicial.....	57
Tabela 5.1. Valores de contagem celular e absorbância para diferentes concentrações.....	68
Tabela 5.2. Repostas em triplicata para a determinação da concentração (g/L) de biomassa microalgal.....	74
Tabela 5.3. Análise da variância (ANOVA) para a concentração de biomassa microalgal.....	76
Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a razão sinal/ruído da concentração de biomassa microalgal.....	78
Tabela 5.5. Repostas em triplicata para a determinação da Produtividade em massa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) da biomassa microalgal.....	80
Tabela 5.6. Análise da variância (ANOVA) para a produtividade em massa da biomassa microalgal.....	82

Tabela 5.7. Análise da variância (ANOVA) para o sinal ruído da produtividade em massa da biomassa microalgal.....	84
Tabela 5.8. Comparação entre métodos de extração de lipídeos.....	85
Tabela 5.9. Repostas em triplicata para a determinação do teor de lipídeos.....	85
Tabela 5.10. Análise da variância (ANOVA) para o teor de lipídeos.....	87
Tabela 5.11. Análise de variância (ANOVA) para a razão sinal/ruído do teor de lipídeos.....	89
Tabela 5.12. Resultados obtidos neste trabalho utilizando o Arranjo Ortogonal de Taguchi L ₈	90
Tabela 5.13. Concentração, produtividade em massa e teor de lipídeos obtidos com a microalga <i>Chlorella sp.</i>	91
Tabela 5.14. Ajuste dos níveis dos fatores sobre o cultivo.....	92
Tabela 5.15. Ajuste dos fatores otimizados pela ferramenta Desirability.....	93
Tabela 5.16. Perfil dos ácidos graxos presentes na composição lipídica.....	94

LISTA DE SIGLAS

AGI	Ácidos graxos insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina-trifosfato
CO₂	Dióxido de carbono
DOE	Design of experiments
MDL	Mecanismo de Desenvolvimento Limpo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaNO₃	Nitrato de sódio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S/N	Sinal ruído

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Contexto.....	20
3.2. Microalga.....	23
3.3. Metabolismo	25
3.4. Meios de cultivo.....	26
3.5. Regime de cultivo	27
3.6. Sistemas de cultivo	29
3.6.1. Sistemas abertos.....	29
3.6.2. Sistemas fechados	30
3.7. Fatores que influenciam o crescimento celular	33
3.8. Síntese de lipídeos em microalgas	34
3.9. Monitoramento do crescimento celular	36
3.10. Colheita da biomassa	37
3.11. Extração de lipídeos	38
3.12. Produção de biodiesel	39
3.13. Planejamento de experimentos	42
3.13.1. Método de Taguchi.....	43
3.13.2. Método Desirability	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Materiais.....	46
4.1.1. Linhagem da microalga	46
4.1.2. Reagentes.....	46
4.2. Equipamentos	47
4.2.1. Fotobiorreatores	47
4.2.2. Outros Equipamentos.....	51
4.3. Procedimentos	52
4.3.1. Preparação dos materiais/acessórios	52
4.3.2. Manutenção da cepa	52

4.3.3. Planejamento experimental	54
4.3.4. Determinação da Concentração Inicial dos Cultivos	56
4.3.5. Colheita e secagem da biomassa	57
4.3.6. Extração dos lipídeos	58
4.3.6.1. Metodologia modificada de Bligh and Dyer	58
4.3.6.2. Metodologia de Folch empregando ultrassom de sonda	58
4.3.7. Síntese do biodiesel	59
4.3.8. Recuperação e purificação do biodiesel	60
4.4. Metodologia analítica	60
4.4.1. Análise microscópica	60
4.4.2. Análise espectrofotométrica	60
4.4.3. Determinação da Relação Entre Contagem Celular e Absorbância	61
4.4.4. Determinação do peso seco	61
4.4.5. Análise do perfil de ácidos graxos	61
4.4.6. Quantificação dos ésteres de etila	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Determinação da concentração inicial dos cultivos	65
5.2. Determinação da relação entre contagem celular e absorbância	67
5.3. Planejamento experimental	69
5.3.1 Concentração (g.L^{-1}) de biomassa obtida	74
5.3.2 Produtividade em massa ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	80
5.3.2 Teor de lipídeos	85
5.3.3 Otimização do cultivo	91
5.4 Perfil lipídico	93
5.5. Síntese do biodiesel	95
6. CONCLUSÃO	97
7. RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

Muitos países planejam aumentar sua matriz energética e reduzir sua parcela nas emissões dos gases causadores do efeito estufa (FRANK *et al.* 2012), que não somente contribuem para o aumento do aquecimento global, mas também na acidificação dos oceanos, que resultam na diminuição dos recifes de corais e na biodiversidade dos ecossistemas marinhos, assim, tais problemas aliado à diminuição das reservas de combustíveis fósseis motivaram muitos países a adotar os biocombustíveis como uma alternativa capaz de reduzir as emissões dos gases causadores do efeito estufa e substituir os combustíveis fósseis (MATA; MARTINS; CAETANO 2010).

Nesse contexto, os biocombustíveis a partir de microalgas são uma alternativa atrativa (ZHANG *et al.* 2010) devido a sua rápida razão de crescimento, alta concentração de lipídeos, pouca ocupação territorial - em comparação com as demais fontes de biocombustíveis - e elevada absorção de CO₂. (JORQUERA *et al.* 2010; SINGH; OLSEN 2011).

Recentemente, as microalgas têm sido reportadas como uma das fontes de biomassa mais promissora para a produção de biodiesel, que envolve a extração de lipídeos da biomassa microalgal seguida da conversão em biodiesel baseado no processo de transesterificação (D'OCA *et al.*, 2011).

Para a produção de biodiesel, muitas espécies de microalgas com diferentes quantidades de lipídeos podem ser utilizadas, como a *Isochrysis* sp. (25-33% de lipídeos), *Nannochloris* sp. (20-35% de lipídeos), *Nannochloropsis* sp. (31-68% de lipídeos), *Neochloris oleoabundans* (35-54% de lipídeos), *Tetraselmes sueica* (15-23% de lipídeos) e *Chlorella* sp. (28-32% de lipídeos) (CHISTI 2007; GOG *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o presente projeto teve como objetivo o estudo do cultivo de microalgas sob condições controladas, visando maximizar a produção de biomassa microalgal, bem como a sua porcentagem em lipídios para posteriormente ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Para tal utilizou-se a técnica de Planejamento de Experimentos, em particular o

Método de Taguchi. Os resultados obtidos neste estudo introduziram estratégias tecnológicas que contribuíram com informações e conhecimentos importantes para o desenvolvimento de novas pesquisas em biocombustíveis.

2. OBJETIVOS

Geral

- Estudar o crescimento de microalgas da espécie *Chlorella sp.* em fotobiorreator em regime batelada para determinar as melhores condições operacionais de crescimento e acúmulo de lipídeos.

Específicos

- Avaliar a concentração da biomassa obtida com a espécie selecionada para o desenvolvimento do trabalho.
- Avaliar a produtividade em massa.
- Avaliar a produtividade lipídica.
- Estudar o efeito do NaNO_3 , CO_2 , profundidade e intensidade luminosa no cultivo das microalgas quanto a obtenção de biomassa e teor lipídico.
- Sintetizar biodiesel a partir dos lipídeos extraídos da biomassa microalgal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Contexto

O mundo atualmente tem se confrontado com uma crise energética devido à depreciação irreversível das fontes tradicionais de combustíveis fósseis, além de sofrer com o aquecimento global ocasionado pelo acúmulo dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera, em especial o dióxido de carbono (CO_2), principal vilão do aquecimento global, (AMARO; CATARINA GUEDES; XAVIER MALCATA, 2011).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2011) a emissão na atmosfera desse elemento a partir da queima de diversos combustíveis gira em torno de 170 milhões de toneladas apenas no Brasil e que o principal combustível que contribui para o acúmulo de CO_2 na atmosfera é o diesel, sendo esperado um cenário em 2020 de 131 milhões de toneladas de CO_2 emitidos na atmosfera associado apenas ao diesel conforme apresenta a Figura 3.1.

Figura 3.1. Projeções das emissões de CO_2 por tipo de combustível

Assim, faz-se necessário encontrar uma fonte de energia alternativa, renovável e ambientalmente correta ao meio ambiente de modo a diminuir a dependência do petróleo, como os biocombustíveis, na qual suas consequentes emissões de CO_2 correspondem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento de sua biomassa (LAL, 2008).

O termo biocombustíveis, segundo Brennan e Owende (2010) refere-se a combustíveis provenientes de matérias primas renováveis. Destacam-se como

biocombustíveis o bioetanol, produzido a partir do processo de fermentação de carboidratos como o açúcar e amido de fontes como a cana-de-açúcar, milho ou grãos (HARUN; DANQUAH, 2011) e o biodiesel, combustível equivalente ao diesel produzido a partir de óleos vegetais (soja, palma, girassol, algodão, amendoim e outros), gordura animal e pelo reuso de óleo proveniente de fritura (AHMAD *et al.*, 2011; KNOTHE *et al.*, 2006).

Aproximadamente 80% do biodiesel produzido no Brasil provem da soja, conforme pode ser observado no gráfico abaixo (Figura 3.2.), em sua maior parte cultivada no centro-oeste nacional (ANP, 2012)

Figura 3.2. Percentual representativo das matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil

Uma das questões delicada que envolve a utilização da soja como matéria prima para produção de biodiesel é a competição com a demanda de alimentos, uma vez que muitos países enfrentam sérios problemas de fome e escassez (CARVALHO JÚNIOR, 2010).

Segundo Takagi *et al.*, (2006), a biofixação de CO₂ por microalgas em fotobiorreatores é uma alternativa sustentável, uma vez que a partir de reações fotossintéticas, átomos de carbono podem ser incorporados a estrutura molecular das células na forma de carboidratos e lipídeos. Além disso, a biomassa produzida pela bioconversão do dióxido de carbono possibilita a obtenção de produtos de valor agregado como, por exemplo, o biodiesel (JACOB-LOPES *et al.*, 2008; YEN; BRUNE, 2007).

Atualmente o biodiesel proveniente de microalgas vem ganhando destaque devido à capacidade de gerar elevadas quantidades de óleos a partir da biomassa seca comparado com as oleaginosas vegetais, além de não competir com a produção agrícola de alimentos (HARUN *et al.*, 2010).

A Tabela 3.1 demonstra abaixo o potencial da produção de óleos por microalgas, que segundo MATA; MARTINS; CAETANO(2010), tem sido descrito como superior quando comparado às culturas oleaginosas convencionais.

Tabela 3.1. Produtividade em biodiesel de diferentes matérias-primas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Matéria-prima	Teor de óleo (%m.m ⁻¹)	Produtividade e 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
Jatropha	28	741	15	656
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

As vantagens associadas à seleção desta matéria-prima lipídica são inúmeras, entre as quais se destacam a rápida taxa de crescimento, elevado rendimento de biomassa, não competição com a cadeia alimentar e a possibilidade de utilizar águas residuais para seu cultivo. Outra vantagem é que o biocombustível gerado a partir de óleo de biomassa gera menos emissões e contaminantes ao combustível derivado do petróleo, portanto reduzem a emissão

de gases poluentes, além de ser possível utilizar o gás carbônico emitido pelas indústrias como fonte de carbono para seu cultivo. (CHISTI, 2007; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; MUTANDA, *et al.*, 2011).

Segundo Lourenço (2006), as emissões de gás carbônico emitidos pelas indústrias poderiam ser concentradas e canalizadas até uma estação de produção de biomassa algácea, ajudando na redução dos excedentes desse gás na atmosfera e oportunizando a produção de biocombustíveis. Após a utilização da biomassa na produção do biodiesel, a parte excedente pode também ser destinada a queima como biogás, conforme apresentado no esquema da Figura 3.3. (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Figura 3.3. Processo conceitual para a produção de biocombustível a partir de biomassa microalgal (CHISTI, 2008).

3.2. Microalga

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos (dotados de clorofila *a*) que podem crescer rapidamente e viver em condições rigorosas devido à sua estrutura unicelular. Podem ser encontradas em todo o mundo, na superfície de alguns tipos de solos e principalmente em ambientes aquáticos, apresentando-se como células isoladas, agrupadas formando colônias ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de células. (LOURENÇO, 2006; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A primeira vez que o ser humano usou microalgas foi há 2000 anos na China, onde a microalga *Nostoc* sp. foi utilizada como alimento para combater a fome. Relatos também apontam que os índios Astecas colhiam as algas de lagos, secavam em pedras e em seguida ingeriam. Contudo a biotecnologia de microalgas só teve início na metade do último século (COLLA; RUIZ; COSTA, 2002; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Por volta de 1919 iniciou-se culturas propriamente ditas com algas, sendo a espécie *Chlorella* sp. a pioneira nesse sentido, verificando-se que certas algas podiam duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia conter 50% de proteína crua (BORZANI *et al.*, 2001).

A espécie *Chlorella* é uma microalga unicelular microscópica, esférica e com diâmetro que varia de 5-10 μm (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000), encontrada comumente em lagos, com grande habilidade de realizar fotossíntese (VONSHAK, 1997).

Segundo Huntley e Redalje (2007), a espécie *Chlorella* é considerada uma candidata promissora para a produção comercial de lipídeos devido ao seu rápido crescimento e fácil cultivo, destacando a *Chlorella* sp. como uma das espécies mais robustas para o cultivo em tanques abertos devido ao seu potencial de resistir a contaminações.

As microalgas armazenam energia na forma de adenosina-trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), compostos utilizados como fonte de energia durante a síntese de carboidratos, e outros compostos orgânicos celulares a partir da água e da redução do CO_2 (LEHNINGER, 1990). Uma parte do carbono fixado é usada para a manutenção celular e para o crescimento, enquanto a outra é estocada (FALKOWSKI, 1997).

As microalgas além de apresentarem um crescimento extremamente rápido, comparando-se com outras oleaginosas, ainda são ricas em óleos e ainda oferecem a vantagem de não comprometer a produção de alimentos (CHISTI, 2007).

Sua composição contém cerca de 50% de carbono na sua biomassa seca, e na maioria dos casos, todo este carbono é obtido a partir do dióxido de carbono atmosférico (CHISTI, 2007; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Micro-organismos fotossintéticos como as microalgas têm sido utilizados em projetos de MDL (mecanismo de desenvolvimento limpo), através do sequestro de CO_2 da

atmosfera a fim de produzir biomassa, além de serem responsáveis por 40% do carbono fotossintetizado no planeta (HENRIKSON, 1994).

Fontes de carbono como o CO₂ aplicado aos cultivos ajudam no aumento de produtividade, minimizando assim custos com produção em escala laboratorial, onde se utilizam sais de custo elevado (MORAIS, 2006).

As microalgas vêm sendo estudadas para a purificação aquática, na qual a aplicação da produção de biocombustíveis em conjunto ao tratamento de esgotos tornou-se uma questão muito discutida atualmente. Tais sistemas fornecem uma via para a remoção de contaminantes químicos, orgânicos, metais pesados e patógenos em águas residuais (MUNOZ; GUIEYSSE, 2006; BRENNAN; OWENDE, 2010).

3.3. Metabolismo

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

No metabolismo autotrófico 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; HUANG *et al.*, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 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. (HUANG *et al.*, 2010; WEN; CHEN, 2003; PEREZ-GARCIA; ESCALANTE *et al.*, 2011).

No cultivo mixotrófico as microalgas conseguem simultaneamente realizar a fotossíntese e consumir 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; CHEN; WALKER, 2011).

3.4. Meios de cultivo

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

Macronutrientes

Classificam-se como macronutrientes carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício 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, regular atividades metabólicas, dentre outras (LOURENÇO, 2006).

Micronutrientes

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

Vitaminas

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

- Tiamina (B₁), que possui função geral de agir como coenzima;
- Biotina (B₇), que atua no transporte de CO₂;
- Cianocobalamina (B₁₂) que não possui ainda um papel metabólico suficientemente elucidado.

3.5. Regime de cultivo

Os cultivos de microalgas podem ser classificados quanto ao seu regime em batelada, semicontínuos e contínuos.

Nos cultivos em batelada as células são inoculadas no meio fresco no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes (LOURENÇO, 2006).

Nos regimes em modo batelada, ao inocular uma população de microalgas em um meio de cultura líquido, com uma fonte de energia adequada, nutrientes necessários, condições químicas e físicas favoráveis em sistema fechado (exceto a troca de gases), é possível seguir o seu crescimento ao longo do tempo e obter uma curva (Figura 3.4.) que mostra as várias fases características do crescimento de populações microbianas (RICHMOND, 2004).

Figura 3.4. Variação da biomassa numa cultura em modo batelada (Adaptado de RUSSO, 2011).

1. Fase de adaptação (Fase Lag):

Trata-se de um período de adaptação das células extraídas de uma cultura em fase exponencial ou estacionária para um meio fresco; esta fase é extensa na presença de tóxicos, de nutrientes dificilmente metabolizáveis ou se o inóculo for de reduzida dimensão ou inadequado.

2. *Fase de aceleração do crescimento:*

Trata-se de um período onde as células já estão adaptadas e começam a multiplicar-se; a taxa específica de crescimento é inferior ao valor máximo.

3. *Fase de crescimento exponencial:*

Fase de crescimento acelerado onde o valor da taxa específica de crescimento se mantém constante, atingindo o seu valor máximo.

4. *Fase de desaceleração do crescimento:*

Nesta fase a concentração de um (ou mais) nutriente(s), tornar-se-á limitante, com o conseqüente decréscimo da taxa específica de crescimento.

5. *Fase estacionária:*

As populações raramente conseguem manter um crescimento exponencial a altas velocidades durante um largo período de tempo, visto que o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pelo acúmulo de produtos inibitórios do metabolismo. Como consequência a velocidade de crescimento diminui e iguala a taxa de morte. A população de micro-organismos mantém, durante algum tempo, uma concentração aproximadamente constante de biomassa à custa da utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido à lise de outras células.

6. *Fase de morte:*

A morte resulta do esgotamento de nutrientes da cultura de micro-organismos. A cinética de morte é também equivalente a uma reação de primeira ordem (RICHMOND, 2004).

Nos cultivos em modo semicontínuos, uma parcela do meio algal é removida e substituída por meio de cultura novo, sem algas. Durante a manipulação do meio de cultivo, por meio da remoção de células, é essencial que todos os demais parâmetros do cultivo (temperatura, intensidade luminosa, composição do meio de cultivo, etc.) sejam mantidos constantes e a coleta das algas realizadas com o cultivo ainda jovem, na fase exponencial, na qual as células apresentam estado fisiológico muito favorável, no sentido de não sofrer com o efeito da diluição do meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

Nos cultivos contínuos ocorre um permanente processo de entrada e saída de cultura em iguais taxas e de modo constante. Para a operação neste modo, deve-se dispor de uma pré-cultura de microalgas que fornecerá o inóculo para

este tipo de cultivo, que pode exigir alguns dias ou semanas para se estabilizar e produzir grandes quantidades de células homogêneas que são extremamente interessantes em nível comercial (LOURENÇO, 2006).

3.6. Sistemas de cultivo

Os cultivos de microalgas para aplicação comercial dependem de estrutura que propicie elevadas densidades celulares, geralmente produzidos em grandes volumes. Esses sistemas compreendem princípios básicos similares de nutrição e crescimento dos cultivos feitos em laboratório, contudo, ocorrem diferenças naturais quanto às dimensões dos sistemas, bem como quanto às formas de aproveitar efetivamente a biomassa formada (LOURENÇO, 2006).

As microalgas podem ser cultivadas tanto em sistemas abertos quanto em sistemas fechados. Cultivos em sistemas abertos são usualmente conduzidos em tanques ou piscinas diretamente expostas ao meio ambiente enquanto cultivos em sistemas fechados são conduzidos em fotobiorreatores, que podem ser divididos em alguns tipos principais como tubular, flat-plate ou coluna (SUALI; SARBATLY, 2012).

3.6.1. Sistemas abertos

Nos sistemas abertos, as microalgas são produzidas em lagoas, tanques ou piscinas ao ar livre, que embora sujeitos a contaminantes e variações quanto aos parâmetros de cultivo, como por exemplo, temperatura e intensidade solar, apresentam baixo custo de instalação e fácil operação, (XU *et al.*, 2009).

Na construção dos sistemas abertos a profundidade varia 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 (CHISTI, 2007). O tipo raceway pond (Figura 3.5) é o sistema mais utilizado tanto em nível de escala piloto quanto em escala comercial devido a sua facilidade de set-up (SUALI; SARBATLY, 2012).

Nos cultivos de microalgas em grande escala a agitação e/ou aeração do sistema acarreta oxigenação do cultivo, aporte de CO₂ ao meio de cultura, exposição de todos os indivíduos à luz e acesso homogêneo das microalgas aos nutrientes (LOURENÇO, 2006).

A aeração é promovida mediante a introdução de ar nos tanques produzindo pequenas bolhas, porém a movimentação proporcionada pela aeração não é suficiente para homogeneizar a distribuição das células enquanto que a agitação de grandes tanques utilizando-se pás giratórias geram misturas hidráulicas eficientes e proporcionam melhores resultados quanto à homogeneização das microalgas.

Figura 3.5. Desenho esquemático de uma raceway pond.

3.6.2. Sistemas fechados

Nos sistemas fechados é comum a utilização de fotobiorreatores, na qual o princípio fundamental de todos os projetos é aumentar a disponibilidade de luz para cada célula (SUALI; SARBATLY, 2012).

Os fotobiorreatores são construídos com materiais opticamente muito transparentes, como vidros e plásticos (principalmente acrílico), permitindo a plena penetração de luz. Em comparação com tanques, os fotobiorreatores apresentam custos mais elevados de construção e operação, porém podem

proporcionar elevada produtividade, gerando mais biomassa algácea por unidade de tempo e volume (LOURENÇO, 2006).

Os sistemas flat-plate (Figura 3.6) são caracterizados por paralelepípedos de vidro, plástico ou outro material que permita a passagem de radiação solar. O ar é injetado pela base enriquecido com dióxido de carbono necessário ao crescimento de biomassa e a promoção de turbulência para que todas as células estejam ao alcance da radiação solar. (HARUN *et al.*, 2010).

Figura 3.6. Esquema de fotobiorreator do tipo flat-plate.

Dentre os tipos de fotobiorreatores em operação no mundo, a maior parte apresenta formato tubular ou cilíndrico, com disposição horizontal ou vertical dos tubos, podendo ser instalados em ambientes fechados, recebendo iluminação artificial, ou dispostos ao ar livre recebendo luz solar (LOURENÇO, 2006).

O princípio dos fotobiorreatores cilíndricos, ou do tipo coluna como apresentado na Figura 3.7, é similar ao dos fotobiorreatores flat-plate, ambos promovem o arejamento e a mistura da coluna pela injeção de ar pela parte inferior. Embora apresentem altas produtividades, há uma possibilidade limitada de aumentar a escala para instalações industriais devido à altura do reator e a profundidade da cultura (GRIMA *et al.*, 1999).

Figura 3.7. Esquema de fotobiorreator do tipo coluna.

Os fotobiorreatores do tipo tubular (Figura 3.8) 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 (SUALI; SARBATLY, 2012). Eles consistem em conjuntos de tubos transparentes, normalmente de vidro ou plástico, cujo diâmetro é inferior a 0,1 m, uma vez que é necessária luz para que ocorra o processo de fotossíntese. Esse tipo de sistema está sujeito ao acúmulo de altas concentrações de oxigênio, ao sobreaquecimento da cultura e à formação de gradientes de pH. Dessa forma, um desgaseificador é habitualmente acoplado aos tubos, tendo como propósito não só a remoção do oxigênio mas também o arrefecimento da cultura. (CHISTI, 2007; GRIMA *et al.*, 1999).

Figura 3.8. Esquema de fotobiorreator do tipo tubular

3.7. Fatores que influenciam o crescimento celular

Fatores como temperatura, luz e nutrientes não afetam somente a taxa fotossintética e a produtividade em biomassa das microalgas, tais fatores afetam também o metabolismo celular e por consequência a composição celular (VONSHAK, 1997). O principal componente de interesse nas microalgas para a produção de biodiesel é o lipídeo, que segundo Suali e Sarbatly (2012) pode atingir altas porcentagens na biomassa pela manipulação do método de cultivo.

Nutrientes

Segundo Lourenço (2006) os macronutrientes apresentam diversas funções em algas marinhas por serem constituintes estruturais abundantes de biomoléculas, de membranas e do meio intracelular, por participarem de processos de trocas de energia e por regularem atividades metabólicas dentre outras funções relevantes.

Dentre os macronutrientes, o nitrogênio é extremamente importante para as algas por ser componente fundamental de classes de substâncias estruturais das células, como ácidos nucleicos e proteínas (LOURENÇO *et al.*, 2004). A deficiência de nitrogênio no meio de cultivo tende a afetar a síntese e acúmulo de lipídeos totais nas células microalgais (VERMA *et al.*, 2010).

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

Intensidade luminosa

A intensidade luminosa tem diferentes efeitos nas espécies microalgais, algumas espécies requerem maior ou menor energia luminosa para conduzir o processo de fotossíntese, e o ciclo luz/escuro (fotoperíodo) na qual o processo de cultivo está submetido tem efeito na acumulação de lipídeo na célula (SUALI; SARBATLY, 2012).

Gás carbônico

A adição de dióxido de carbono no meio de crescimento é essencial para alcançar alta produtividade celular para quase todas as espécies de microalgas (SUALI; SARBATLY, 2012).

Segundo Huang *et al* (2010) tanto fontes de carbonos inorgânicos (CO_2 e Na_2CO_3) e orgânicos (acetato, glicose, entre outros) podem ser assimilados pelas microalgas na formação da biomassa e induzir a produção de lipídeos.

Temperatura

O crescimento celular e a porcentagem lipídica são fortemente afetados pela temperatura, dependendo da espécie, ao aumentar a temperatura observa-se o aumento no teor de lipídeos (VERMA *et al*, 2010).

Microalgas da espécie *Chlorella* são boas produtoras de lipídeos quando cultivadas a temperaturas entre 25 a 30°C, embora sejam capazes de crescer em temperaturas a partir de 16°C (SUALI; SARBATLY, 2012).

Profundidade

Segundo Chist (2007), em sistemas de cultivo realizadas em tanques, deve-se levar em consideração que quanto maior a profundidade menor a penetração da luz até o fundo do tanque, afetando negativamente a taxa de fotossíntese e por conseguinte o crescimento celular no meio, sendo comum trabalharem com profundidades entre 10 a 50 cm para tanques dispostos ao ar livre.

3.8. Síntese de lipídeos em microalgas

Segundo Lourenço (2006) os lipídeos de algas são constituídos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados (AGS) ou insaturados (AGI) e desempenham inúmeras funções biológicas como, por exemplo, isolantes térmicos e componentes de reservas de energia.

As microalgas sintetizam os lipídeos a partir da fonte de carbono, seja inorgânico (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 espécies de microalgas como a *Botryococcus braunii* podem produzir teores de lipídeos em torno de 75%, assim como a espécie *Schizochytrium sp.* pode atingir teores de lipídeos próximos a 77% conforme apresentado na Tabela 3.2, porém com baixa produtividade de biomassa. Entretanto espécies como a *Chlorella vulgaris*, requerem menor tempo de cultivo e apresentam alta produtividade celular, porém atingem quantidades de lipídeos inferiores a 20% (CHISTHI, 2007; BRENNAN; OWENDE, 2010).

Tabela 3.2. Espécies produtoras de lipídeos e suas respectivas porcentagens em relação a massa seca (CHISTHI, 2007).

Espécies	Conteúdo de óleo (% em massa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella sp.</i>	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochysis sp.</i>	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20 – 35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia sp.</i>	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

Além do teor lipídico, deve-se atentar ao perfil dos ácidos graxos presentes no material lipídico, uma vez que, características estruturais das moléculas de

ácidos graxos como o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações refletem propriedades finais ao biodiesel, determinando assim a sua qualidade (KNOTHE *et al.*, 2003).

De um modo geral, biodiesel oriundo de lipídeos que possuem em sua composição elevadas quantidades de ácidos graxos de cadeia insaturada, com destaque para os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) provocam problemas na ignição do combustível, auto-oxidação e entupimentos de filtros no motor que implicam em falhas no funcionamento do motor. Entretanto composições lipídicas ricas em ácidos graxos saturados, em especial os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) conferem ao biodiesel uma boa qualidade como uma ignição adequada e estabilidade de operação. (KNOTHE *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2005).

3.9. Monitoramento do crescimento celular

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 faz-se essencial para determinar o momento ótimo para coleta da biomassa formada. Os principais métodos utilizados para acompanhar o crescimento celular é a contagem de células por microscopia e a medida da densidade óptica por espectrofotometria (LOURENÇO, 2006).

A Contagem direta por microscopia é a técnica mais simples e tradicional para monitorar o crescimento de microalgas, por intermédio de uma câmara de contagem, como por exemplo, uma câmara de Neubauer, um número de células algáceas presentes em um determinado volume é contado com o auxílio de um microscópio ótico com capacidade de aumento de pelo menos 400 vezes. Nas contagens em microscópio, a densidade de indivíduos é geralmente expressa como o número de células por mililitro de cultivo (LOURENÇO, 2006).

O crescimento de microalgas pelo uso da densidade óptica se baseia na obstrução 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. Utiliza-se um espectrofotômetro para realizar as medições de um cultivo de microalgas num comprimento de onda de 570nm (LOURENÇO, 2006).

3.10. Colheita da biomassa

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 elas crescem em culturas muito diluídas, o que faz necessário o processamento de grandes quantidades de líquidos para a sua colheita, desprendendo alto consumo energético. (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

Os métodos tradicionalmente utilizados para colheita de microalgas são a filtração, sedimentação, centrifugação e a floculação.

O método de filtração consiste em submeter o meio de cultivo a passar por uma membrana de poros reduzidos que retêm as células microalgais e permitem apenas a passagem do meio líquido (BABEL; TAKIZAWA; OZAKI, 2002). Na filtração de pequenos volumes, utiliza-se um aparato de filtração como um frasco de Kitasato ou similar, porém num 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 (LOURENÇO, 2006).

A sedimentação é um processo lento que envolve a separação das células de microalgas do meio de cultivo pela ação da força gravitacional, portanto, um processo simples, porém com baixa eficiência (LOURENÇO, 2006; DE GODOS *et al.*, 2011).

Em contra partida, 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 que requer alto consumo de energia. Por esta técnica a biomassa é concentrada sem a adição de produtos químicos, conservando suas características originais (LOURENÇO, 2006; VERMA *et al.*, 2010; DE GODOS *et al.*, 2011).

Por outro lado, 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 (coagulação),

ou pela formação de ligações entre as microalgas, permite recuperar a biomassa com menores custos econômicos quando comparado à centrifugação (DE GODOS *et al.*, 2011).

3.11. 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 populares (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 com o qual a biomassa se encontra em contato. Os processos que ocorrem são totalmente físicos, pois o óleo transferido para o solvente é recuperado sem nenhuma reação química. (REGITANO-D'ARCE, 1987).

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 de células microbianas (GREENWELL *et al.*, 2010).

Métodos como o choque osmótico na qual uma brusca redução na pressão osmótica rompe as células e libera o óleo de seu interior, a extração com CO₂ supercrítico, método eficiente que utiliza propriedades como a baixa viscosidade e elevada difusividade do CO₂ supercrítico para alcançar maior eficiência de extração e a extração enzimática que utiliza enzimas para degradar a parede celular são métodos empregados apenas em escala de laboratório devido a altos custos operacionais. (HALIM *et al.*, 2011; SUALI; SARBATLY, 2012).

3.12. Produção de biodiesel

O biodiesel é o combustível substituto natural e renovável ao diesel de petróleo produzido a partir de óleos vegetais como a soja, palma, girassol e pinhão manso e/ou gordura animal como o sebo bovino e gordura de frango, ou seja, quaisquer fontes que disponha de lipídeos podem em tese, serem úteis à produção de biodiesel (LOURENÇO, 2006; SUAREZ *et al.*, 2009; AHMAD *et al.*, 2011).

Matérias-primas de primeira geração como a soja, palma e girassol não são consideradas sustentáveis porque competem com a demanda de alimentos (BRENNAN; OWENDE, 2010). Em contra partida matérias-primas de segunda geração como o 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 compete com a cadeia de alimentos (SUAREZ *et al.*, 2009).

Por outro lado, as microalgas, assim como as cianobactérias pertencem ao grupo de matérias-primas de terceira geração, elas se apresentam como uma alternativa promissora, pois são capazes de acumular altos teores de lipídeos aliado a rápida taxa de crescimento e produtividade de biomassa comparada a safras de oleaginosas convencionais, além de não competir com a cadeia de alimentos (AHMAD *et al.*, 2011; DEMIRBAS, 2011; DA RÓS, 2012).

Neste contexto, 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 em ésteres alquílicos de ácidos graxos e água, ambas as reações ocorrem na presença de álcoois e catalisador. (DEMIRBAS, 2010; AMARO, CATARINA GUEDES; XAVIER MALCATA, 2011).

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, é utilizado um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio no sentido de formação dos produtos por se tratar de uma reação reversível. (DEMIRBAS, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

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 3.9. (DEMIRBAS, 2010).

Figura 3.9. Reação de transesterificação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Ambas as reações podem ser catalisadas homoganeamente ou heterogeneamente. Os catalisadores homogêneos podem ser ácidos (ácido sulfúrico, sulfônico e clorídrico) ou alcalinos (hidróxidos de sódio ou potássio), enquanto os catalisadores heterogêneos podem ser enzimas ou compostos metálicos. (SUN *et al.*, 2010)

Embora nos processos de produção de biodiesel domine a catálise alcalina, porque permite condições de reação moderadas, altos níveis de conversão e reações mais velozes, a escolha do catalisador deve levar em consideração a característica do óleo usado que depende do conteúdo de ácidos graxos livres (DEMIRBAS, 2010).

O índice de acidez é a principal característica do óleo utilizado a ser observado na escolha do catalisador, 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 apresenta o esquema da Figura 3.10. (DEMIRBAS, 2010).

Figura 3.10. Esquema de reação de esterificação

Leung, Wu e Leung (2010) explicam que de um modo geral existirão vantagens e desvantagens associadas à escolha do tipo de catalisador como mostra a Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Vantagens e desvantagens quanto ao tipo de catalisador

Catalisador	Vantagem	Desvantagem
Alcalino	Alta atividade catalítica, baixo custo e condições operacionais moderadas	Necessita que a matéria-prima apresente baixo índice de acidez para evitar a formação de sabão
Ácido	Evita a formação de sabão	Corroem equipamentos e exigem tempos de reação elevados
Heterogêneo (compostos metálicos e enzimas)	Altamente seletivos e recicláveis	Apresentam alto custo

Segundo Miao (2006), 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 observado na Tabela 3.4 que destaca o processo de síntese de biodiesel utilizado por alguns pesquisadores.

Tabela 3.4. Processos de síntese de biodiesel da microalga *Chlorella*.

Microalga	Catalisador	Observações	Referência
<i>Chlorella sp</i>	H ₂ SO ₄	Razão molar (álcool:lipídeo) 30:1, 100°C e 4h	LEMOES (2011)
<i>Chlorella protothecoides</i>	H ₂ SO ₄	Razão molar (metanol:lipídeo) 56:1, 30°C e 4h	MIAO (2006)
<i>Chlorella</i>	H ₂ SO ₄	Razão molar (álcool:lipídeo) 315:1, 90°C e 12h	EHIMEM et. al, (2010)

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 presente 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 éster, excesso de álcool e catalisador (ácido ou base) e formação da camada inferior dominada pelo glicerol (SUALI; SARBATLY, 2012).

Alternativamente ao método tradicional de transesterificação, um método promissor é a transesterificação *in situ*, processo na qual a conversão dos ácidos graxos em seus alquil ésteres ocorre diretamente na biomassa, eliminando assim a etapa de extração por solvente e aliviando a necessidade da secagem da biomassa durante a colheita reduzindo drasticamente o custo do processo (AMARO; CATARINA GUEDES; XAVIER MALCATA, 2011).

3.13. Planejamento de experimentos

Planejamento experimental é definido como um conjunto de técnicas estatísticas aplicadas ao planejamento, condução, análise e interpretação de testes controlados, buscando encontrar e definir fatores que influenciam os valores de um parâmetro ou um grupo de parâmetros de interesse (BRUNS; NETO; SCARMÍNIO, 2010).

A otimização de parâmetros de processo e a melhoria da qualidade de produtos têm sido amplamente utilizada com o planejamento experimental através da aplicação de conceitos da engenharia e estatística (WANG; HUANG, 2007).

Segundo Fraceschini e Macchietto (2008), o planejamento experimental ou *design of experiments* (DOE) é uma ferramenta estatística que visa maximizar o valor das variáveis respostas obtidas em cada experimentação, além de reduzir o número de condições experimentais, a fim de minimizar custo e tempo.

O planejamento experimental leva em consideração as interações entre as variáveis e pode ser utilizado para a otimização dos parâmetros operacionais em sistemas multivariáveis (AY; CATALKAYA; KARGI, 2009).

3.13.1. Método de Taguchi

O método de Taguchi é considerado como uma robusta ferramenta matemática, capaz de descobrir os parâmetros significativos de um processo ideal através de aspectos qualitativos múltiplos (CHIANG; HSIEH, 2009).

De acordo com Barrado *et al.* (1996), a aplicação do Método de Taguchi consiste em:

- Selecionar as variáveis resposta, a serem otimizadas;
- Identificar os fatores (variáveis de entrada) e escolher os seus níveis;
- Selecionar o arranjo ortogonal apropriado conforme literatura (TAGUCHI; KONISHI, 1987);
- Executar os experimentos de maneira aleatória para evitar a incorporação de erros sistemáticos;
- Analisar os resultados utilizando a relação sinal-ruído (S/N) e análise de variância (ANOVA);
- Determinar o melhor ajuste dos parâmetros.

Em um processo o desempenho pode ser comprometido por fatores controláveis e não controláveis. As variáveis controláveis são os parâmetros do processo, enquanto que variáveis não controláveis são os sinais-ruído, ou seja, fatores que interferem na variabilidade experimental (YANG; HWANG; LEE, 2002). A Figura 3.11 apresenta ilustra um diagrama de processo.

Figura 3.11. Fatores influentes em um processo (YANG; HWANG; LEE, 2002).

O Método de Taguchi é capaz de oferecer vantagens como a redução da variabilidade do processo, conformidade próxima do resultado desejado e,

consequentemente, a redução dos custos operacionais (BARROS; BRUNS; SCARMINIO, 1995). Além disso, o método utiliza arranjos ortogonais que permitem estudar diversos fatores com um número reduzido de experimentos (SHARMA *et al.*, 2005).

No estudo estatístico do método de Taguchi é aplicada a análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar a significância dos parâmetros utilizados no processo (ROSA *et al.*, 2009).

3.13.2. Método Desirability

O método Desirability é um algoritmo criado originalmente por Harrington (1965) que posteriormente foi aprimorado por Derringer e Suich (1980), para tratar da otimização simultânea de modelos de múltiplas respostas. Este método é capaz de avaliar um conjunto de respostas simultaneamente, permitindo determinar o conjunto de condições mais desejáveis para as propriedades estudadas (VAN GYSEGHEM *et al.*, 2004).

Ao utilizar a formulação unilateral ou bilateral de Harrington (1965) e Derringer e Suich (1980) apresentada pela Equação 3.1 é possível encontrar o índice global D, que deve se encontrar entre o intervalo [0,1]. Este índice é determinado a partir da combinação de cada uma das respostas transformadas (d_i) através de uma média geométrica e será maximizado quando todas as respostas se aproximarem o máximo possível de suas especificações. Quanto mais próximo de 1 estiver D, mais próximas as respostas originais estarão de seus respectivos limites de especificação (ROSSI, 2001).

$$D = (d_1(Y_1) \cdot d_2(Y_2) \cdot K \cdot d_u(Y_u))^{1/u} \quad \text{Equação 3.1}$$

Cada uma das respostas do conjunto original é transformada de modo que d_i pertença ao intervalo $0 \leq d_i \leq 1$. O valor de d_i aumenta quando a i -ésima resposta se aproxima dos limites impostos. O ponto de ótimo geral do sistema é o ponto de ótimo alcançado pela maximização da média geométrica (Equação 3.1),

calculada a partir das funções desirability individuais. A utilização da média geométrica tem a vantagem de fazer com que a solução global seja alcançada de maneira balanceada, permitindo que todas as respostas atinjam os valores esperados e forçando o algoritmo a se aproximar das especificações impostas. (WU, 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagem da microalga

Todos os experimentos foram realizados com a linhagem da microalga marinha *Chlorella sp.* (chlor-CF) isolada em Cabo Frio, 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.

4.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução dos experimentos e na preparação dos meios de cultura foram de grau padrão analítico para microbiologia, que permitem menor variabilidade e maior precisão no meio de cultivo. A Tabela 4.1. apresenta os reagentes necessários para a preparação do meio f/2 sem sílica (GUILLARD, 1975).

Tabela 4.1. Reagentes utilizados para a preparação do meio de cultivo.

Reagentes	Concentração
Sal marinho	33,3 g/l
NaNO ₃	75g/l
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5g/l
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15g/l
Na ₂ EDTA	4,3g/l
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22,2mg/l
MnCl ₂ . 4H ₂ O	180mg/l
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	6,3mg/l
CoCl ₂ . 6H ₂ O	10mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8mg/l
Tiamina(B1)	100mg/l
Cianocobalamina (B12)	0,5mg/l
Biotina (B7)	0,5mg/l

4.2. Equipamentos

4.2.1. Fotobiorreatores

Foi projetado um sistema de tanques fotossintéticos composto por seis reatores cúbicos (14x20x30 cm) onde foram alocadas pedras porosas a fim de promover a agitação do meio de cultivos por inserção de ar comprimido fornecido por compressor de ar BOYU modelo ACQ-003 e CO₂. Foram instalados refletores sobre os tanques fotossintéticos para promover a iluminação do cultivo durante os experimentos conforme Figura 4.1.

Figura 4.1. Desenho esquemático de um tanque fotossintético e iluminação

Os reatores fotossintéticos, que receberam os meios de cultivos, foram dispostos dentro de caixas plásticas por onde circulou água fria proveniente de um trocador de calor da marca Gelaqua, que teve como objetivo arrefecer a temperatura do meio de cultivo devido ao calor fornecido pelas lâmpadas conforme a Figura 4.2.

Figura 4.2. Desenho explicativo do fotobiorreator, esquema do sistema de arrefecimento e imagem do detalhe da entrada e saída de água de arrefecimento.

A fim de minimizar a entrada de contaminantes nos tanques fotossintéticos as caixas plásticas permaneceram fechadas com tampas adaptadas com vidros transparente para permitir a passagem dos raios luminosos conforme apresentado na Figura 4.3.

Tampa adaptada

Figura 4.3. Detalhe da tampa adaptada

A Figura 4.4. apresenta o esquema do sistema de fotobiorreatores e a Figura 4.5 a imagem do sistema utilizado.

Figura 4.4. Esquema do sistema de fotobiorreatores

Figura 4.5. Imagem do sistema de fotobiorreatores

Assim foram controlados quatro parâmetros:

- intensidade de iluminação (klux);
- CO_2 (%);
- concentração de NaNO_3 ;
- profundidade do cultivo (cm);

Intensidade luminosa

A intensidade luminosa foi fornecida por lâmpadas halógenas posicionadas sobre os tanques fotossintéticos, onde foram utilizadas lâmpadas com potências diferentes, 150W a 500W, a partir da qual foi obtido o seu valor correspondente em klux com o auxílio de um luxímetro. As lâmpadas obedeceram a um fotoperíodo de 12h luz/escuro controlado por um temporizador que ascendia automaticamente as lâmpadas às 08h00min e desligava às 20h00min diariamente durante os cultivos.

Vazão de CO₂

O CO₂ foi fornecido por intermédio de um cilindro de 25 kg, provido de uma válvula reguladora solenoide ligado a um temporizador que acionava a abertura da válvula automaticamente durante o período luminoso do fotoperíodo. A vazão da injeção de CO₂ foi controlada por um rotâmetro e distribuída no meio de cultivo por pedra porosa.

Concentração de nitrato

Foi utilizado o sal Nitrato de Sódio (NaNO₃) solubilizado no meio de cultivo em concentrações diferentes.

Profundidade

A profundidade foi medida pela altura em centímetro da coluna do meio de cultivo como ilustra a Figura 4.6.

Figura 4.6. Identificação da profundidade

4.2.2. Outros Equipamentos

Outros equipamentos utilizados foram: balança analítica (Modelo 210/L, ADA), espectrofotômetro UV-Vis (Modelo Bel Photonics), pHmetro (Modelo DM-22, Digimed), Compressor de ar (Modelo ACQ-003, BOYU), processador ultrassônico (Modelo UP2005 Hielscher), lavadora ultrassônica (Modelo USC 1800A UltraSonicCleaner, Unique), rota evaporador (Modelo 801, Fisatom), centrífuga (Modelo 206 BL, Excelsa II, Fanem), centrífuga de bancada refrigerada com capacidade de 2L (Modelo SP-701, SPLABOR), liofilizador (Modelo LT1000, Terroni), Microscópio ótico (Bioval), Câmara de Neubauer (New Optics),

Luxímetro (Modelo AK308, AKSO), Refletores (Golden), Temporizadores (Brasforte) e Rotâmetro (Blaster);

4.3. Procedimentos

4.3.1. Preparação dos materiais/acessórios

Para cada inoculação/cultivo, todo o material a ser usado foi lavado em água corrente e detergente, passado por água destilada e autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. As tampas de borracha dos frascos com os respectivos tubos para arejamento e respiração e as mangueiras de silicone foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos na alínea anterior, com exceção da autoclavagem, devido à baixa resistência a elevadas temperaturas. Este passo foi substituído por fervura a 100 °C durante 5 min. Para os Erlenmeyers de ensaio foram feitas rolhas de algodão e gaze desinfetadas com álcool etílico (96% v/v) e posteriormente colocadas numa estufa a 80 °C durante 60 minutos.

A inoculação das microalgas foi efetuada sempre próxima à chama do bico de bunsen e o cultivo em sala climatizada, sobre bancadas e prateleiras, com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes e halógenas. A intensidade da radiação luminosa foi medida com um luxímetro e a temperatura da sala mantida por um aparelho de ar condicionado.

As soluções estoque utilizadas na preparação do meio de cultivo foram autoclavadas a 0,5 atm de pressão e 110°C de temperatura, com exceção da solução de vitaminas, que foi esterilizada por meio de filtros com poros de 0,22µm para evitar degradação térmica (HARRISON; BERGES, 2005).

4.3.2. Manutenção da cepa

Para a manutenção da cepa foi confeccionado uma caixa de madeira provida com uma lâmpada fluorescente de 15W ligada a um temporizador que controlou o fotoperíodo em 12 h: 12 h luz/escuro, na qual pequenos volumes da

cepa microalgal foram mantidas a fim de fornecer células durante todo o período de experimentos. A Figura 4.3.2.1. ilustra o aparato utilizado para a manutenção da cepa.

Figura 4.7. A- Desenho esquemático do cepário. B- Imagem dos frascos para manutenção da cepa. C- Imagem do cepário.

Para a manutenção de um banco de células independentemente dos inóculos preparados para os experimentos, foram adotados os seguintes procedimentos:

Repicagens em erlenmeyers de 125 mL (volume útil de 100mL): temperatura de 22 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h: 12 h luz/escuro e luminosidade média de 4,8 klux, dependendo da localização dos frascos na incubadora. Foram mantidos sempre quatro erlenmeyers, gerados por repicagens com intervalos entre 10 a 15 dias. Cada repicagem foi realizada na proporção de 1:10 (10mL da cultura antecessora para 90mL de meio de cultura novo). Os tubos foram agitados suavemente de forma manual uma vez ao dia.

Repicagens em balões volumétricos de 2000 mL de volume (volume útil de 1000 mL): temperatura de 22 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h: 12 h luz/escuro e

luminosidade média de 6,0 klux. Os balões foram mantidos em prateleiras, gerados por repicagens com intervalos entre 10 a 15 dias, servindo como estoque de inóculo para a execução dos experimentos. Cada repicagem foi realizada na proporção de 1:10 (100mL da cultura antecessora para 900mL de meio de cultura novo). Os balões recebem agitação por 12 h durante o dia por intermédio de bombas de aquários.

4.3.3. Planejamento experimental

Com base em pesquisas bibliográficas foram utilizados para o estudo os seguintes parâmetros: intensidade luminosa (klux); CO₂ (%); concentração de NaNO₃ (g/l) e profundidade (cm).

- Intensidade luminosa

A intensidade luminosa fornecida pelas lâmpadas halógenas de 150W e 500W posicionadas sobre os tanques fotossintéticos foi medida com auxílio de um luxímetro conforme apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Intensidade luminosa fornecida pelas lâmpadas

Potência da lâmpada (W)	Intensidade Luminosa (Klux)
150	0,85
500	14,5

- CO₂

Os cultivos foram submetidos a 5% e 10% de CO₂ medidos com o auxílio de um rotâmetro que permitiu controlar as vazões de injeção de CO₂ em relação à vazão de ar comprimido inserido ao meio para a agitação, que possibilitou determinar a porcentagem do CO₂ para cada experimento pela equação 4.3.3.1.

$$\% \text{ de } CO_2 = \frac{\text{Vazão de } CO_2}{\text{Vazão de ar comprimido}} \times 100$$

Equação 4.1

$$\text{Vazão de ar comprimido} = 6,67 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\text{Vazão}_1 \text{ de } CO_2 = 0,33 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\text{Vazão}_2 \text{ de } CO_2 = 0,66 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$$

- Concentração de Nitrato

Foi utilizado o sal nitrato de sódio (NaNO_3) solubilizado no meio de cultivo nas concentrações de $0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

- Profundidade

Foram utilizadas duas medidas de profundidade, 5 cm e 10 de coluna do meio de cultivo.

A Tabela 4.3 apresenta os fatores de interesse em 2 níveis que foram estudados bem como a codificação utilizada para representá-los.

Tabela 4.3. Fatores de operação dos experimentos e codificação dos níveis.

Códigos	Fatores	Níveis	
		1	2
A	Luminosidade (klux)	0,85	14,5
B	CO_2 (%)	5	10
C	NaNO_3 (g/L)	0,25	0,75
D	Profundidade (cm)	5	10

Em relação à modelagem matemática foi utilizado um planejamento fatorial L_8 em triplicata, na qual os conjuntos de dados foram obtidos através de uma matriz ortogonal de Taguchi L_8 , conforme Tabela 4.4. com as variáveis de entrada, como: Intensidade luminosa, concentração de NaNO_3 , profundidade e % de CO_2 .

Tabela 4.4. Arranjo Ortogonal de Taguchi L₈

Experimento	A	B	AB	C	AC	AD	D
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

Os fatores avaliados na matriz ortogonal de Taguchi em dois níveis de operação foram descritos da seguinte maneira: A – Intensidade luminosa, B – (%) Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO₃, D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Desse modo foram obtidas como variáveis respostas a concentração de biomassa (g.L⁻¹), produtividade em massa (mg.L⁻¹.dia⁻¹), teor lipídico (%) e produtividade lipídica (mg.L⁻¹.dia⁻¹).

4.3.4. Determinação da Concentração Inicial dos Cultivos

A fim de padronizar a concentração celular inicial dos experimentos foram iniciados três cultivos com diferentes concentrações celulares e acompanhou-se o desenvolvimento do crescimento celular de acordo com a Tabela 4.5. A condição experimental imposta para os experimentos está descrito na Tabela 4.6.

Tabela 4.5. Concentração celular inicial

Cultivo	Concentração celular inicial (célula.mL ⁻¹)
Fotobiorreator 1	5,5x10 ⁶
Fotobiorreator 2	3x10 ⁶
Fotobiorreator 3	0,7x10 ⁶

Tabela 4.6. Condição experimental utilizada na determinação da concentração celular inicial.

Fator	Níveis
Intensidade luminosa (klux)	14,5
Vazão de CO ₂ (%)	5
NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	0,75
Profundidade (cm)	5

4.3.5. Colheita e secagem da biomassa

Utilizaram-se dois métodos de colheita da biomassa, centrifugação da cultura e floculação induzida por hidróxido de sódio 1M (Figura 4.7).

O método de centrifugação adotado consistiu em submeter 4 volumes de 500 mL a uma velocidade de 3500 rpm por 45 minutos em centrífuga refrigerada.

O procedimento de floculação adotado consistiu na adição de 10 mL da solução da base em provetas de 1L contendo o meio de cultivo a fim de se obter a formação dos flocos celulares, caso passados 5 min não fosse observada a floculação, repetia-se o procedimento até observar a formação dos flocos. Após a total floculação, filtrou-se o conteúdo em papel de filtro qualitativo até que ficasse retida apenas a biomassa úmida. Em seguida realizou-se três lavagens da biomassa com solução de formiato de amônio 0,6 M para a retirada do sal marinho utilizado no cultivo. Por fim, a biomassa foi congelada para ser liofilizada posteriormente.

Figura 4.8. Esquema adotado para a floculação

4.3.6. Extração dos lipídeos

Os lipídeos foram extraídos de 1g de biomassa liofilizada utilizando-se a metodologia modificada de Bligh and Dyer (1959) o a metodologia de Folch (1957) empregando ultrassom de sonda.

O extrato lipídico obtido foi submetido à remoção do solvente em rota-evaporador e em seguida alocado em estufa (60°C) até obtenção de massa constante. O percentual de lipídeos em g/100g de biomassa foi determinada pela equação 4.2.

$$\%Lipídeos = \frac{Massa\ final\ de\ lipídeos}{Massa\ da\ biomassa\ seca} \times 100 \quad \text{Equação 4.2.}$$

4.3.6.1. Metodologia modificada de Bligh and Dyer

Os lipídeos foram extraídos de amostras de 1 g da biomassa liofilizada segundo a metodologia modificada de Bligh and Dyer (1959) na qual foi colocada inicialmente em um béquer os solventes clorofórmio, metanol e água na proporção 1:2:0,8, respectivamente. A mistura foi colocada para agitar em uma placa de agitação magnética durante 2 horas. Após esse tempo, filtrou-se a mistura em papel de filtro qualitativo e descartou-se a massa retida. O filtrado foi levado a um funil de separação e adicionou-se clorofórmio e água para promover a separação da fase apolar (lipídica) e polar, por fim foi realizada a evaporação do solvente em rota-evaporador a 60°C.

4.3.6.2. Metodologia de Folch empregando ultrassom de sonda

O extrato lipídico foi obtido a partir da biomassa seca utilizando a metodologia de Folch e colaboradores (1957), com algumas modificações. Iniciou-se o procedimento adicionando uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1) em relação a biomassa seca, juntamente com um terço do volume de clorofórmio para homogeneização completa da biomassa no solvente. Em seguida a amostra foi filtrada em filtro de papel e o filtrado foi misturado a uma solução de KCl 0,88% (1/4 em relação ao volume da amostra) e aguardou-se a separação das fases

num funil de separação. A fase inferior foi recolhida e submetida a uma mistura de metanol-água (2:1) e aguardado a separação das fases. O extrato lipídico foi seco em rota-evaporador para remoção do solvente.

A separação das fases em ambas as metodologias pode ser observado na Figura 4.9.

Figura 4.9. Separação das fases polar e apolar

4.3.7. Síntese do biodiesel

A reação de síntese do biodiesel ocorreu por via química utilizando um banho de ultrassom, na qual as frações lipídicas foram solubilizados em etanol (razão molar álcool:extrato lipídico, 30:1) na presença de 10% de H_2SO_4 como catalisador a temperatura de $60^{\circ}C$ por 4h. A montagem experimental utilizada pode ser visualizada na Figura 4.10.

Figura 4.10. Esquema reacional de síntese do biodiesel.

4.3.8. Recuperação e purificação do biodiesel

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

4.4. Metodologia analítica

4.4.1. Análise microscópica

A contagem celular foi realizada num microscópio modelo BIOVAL com o auxílio de um hemacitômetro, tipo câmara de Neubauer de 0,1mm de profundidade. (LOURENÇO, 2006).

4.4.2. Análise espectrofotométrica

O crescimento microalgal foi acompanhado por análise de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis modelo Bel Photonics, selecionando o comprimento de onda de 570nm na qual uma alíquota de 4mL foi coletada diariamente para a realização das leituras em triplicata, que foram relacionadas ao método de contagem celular por meio de uma curva de calibração para acompanhar o crescimento celular. (LOURENÇO, 2006).

4.4.3. Determinação da Relação Entre Contagem Celular e Absorbância

Para determinar a curva que relaciona as duas análises, foram preparadas soluções de diferentes concentrações, obtidas por meio de diluições de alíquotas de um mesmo meio de cultivo.

Em um balão volumétrico de 25mL foi adicionada uma alíquota de 2,5mL do cultivo microalgal e completou-se o volume com água destilada até atingir o menisco. Homogeneizou-se e retirou-se 0,1mL para análise microscópica na câmara de Neubauer e 4mL para análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 570nm. O mesmo procedimento foi realizado para alíquotas de 5mL, 10mL, 15mL, 20mL e 25mL do meio de cultivo.

4.4.4. Determinação do peso seco

A biomassa liofilizada foi levada para determinação do teor de umidade em um detector de umidade MARTE, modelo ID50, utilizando-se uma amostra de 0,1 g. Em seguida a biomassa total foi pesada em uma balança analítica e descontou-se a porcentagem de umidade determinada anteriormente do valor obtido na pesagem.

4.4.5. Análise do perfil de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos 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°C (5°C/min) e 215°C – 24 min e hélio como gás de arraste. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram os ácidos capróico (C6:0); caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); láurico (C12:0); mirístico (C14:0); miristoléico (C14:1); pentadecanóico (C15:0); palmítico (C16:0); palmitoléico (C16:1); margárico (C17:0); cis-10-heptadecenóico (C17:1); esteárico

(C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); α – linolênico (C18:3 n-3); araquídico (C20:0); eicosenóico (C20:1); beênico (C22:0); erúcico (C22:1); lignocérico (C24:0) e nervônico (C24:1).

4.4.6. Quantificação dos ésteres de etila

A conversão dos triglicerídeos em ésteres obtidos por via química foi determinada tomando por base os dados gerados por RMN utilizando a metodologia descrita por Garcia (2006)

Como pode ser observado na Figura 4.11, no quarteto gerado pelos prótons do CH₂etoxílico o desdobramento em menor deslocamento químico (4,09) é o único pico de ressonância que não apresenta sobreposição com nenhum outro sinal dos mono-, di- ou triglicerídeos.

Figura 4.11. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ¹H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos (GARCIA, 2006).

Através do fenômeno denominado desdobramento spin-spin, os picos de ressonância sofrem desdobramentos, que podem ser explicados empiricamente pela regra do $n+1$. Segundo esta regra, cada tipo de próton “sente” o número de prótons equivalentes (n) do átomo de carbono vizinho ao átomo de carbono ao qual um dado próton está ligado. Assim, seu pico de ressonância se desdobra em $(n+1)$ componentes. Esses desdobramentos obedecem ao triângulo de Pascal, conforme indicado na Figura 4.12.

Figura 4.12. Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do $n+1$ (GARCIA, 2006).

O pico de ressonância dos átomos de hidrogênio do CH_2 etoxílico dos ésteres etílicos é desdobrado em um quarteto, cuja área total é a somatória dos componentes externos do quarteto (menores intensidades), que possuem uma área igual a $1/8$ da área total mais os componentes internos (maiores intensidades), que têm áreas iguais a $3/8$ da área total do quarteto, como esquematizado na Figura 4.13.

Em que:

A_{c1} = área do componente 1;

A_{c2} = área do componente 2;

A_{c3} = área do componente 3;

A_{c4} = área do componente 4;

Figura 4.13. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio do CH_2 etoxílico dos ésteres etílicos (GARCIA, 2006)

O componente 4 (Ac4) do quarteto dos ésteres etílicos (δ na faixa de 4,07 a 4,08ppm) é o único pico que não sofre sobreposição de nenhum outro pico, portanto esse componente foi utilizado no cálculo da conversão da etanolise de óleos vegetais, segundo a Equação 4.3.

$$\%EE = [(A_{C4} \times 8) / A_{dd+ee}] \times 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

Em que:

A_{C4} = Área do componente c4;

A_{dd+ee} = Área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05ppm;

%EE = Porcentagem de ésteres etílicos de óleos vegetais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um modo geral o trabalho compreendeu cinco etapas;

- Cultivos segundo o planejamento experimental proposto;
- Colheitas da biomassa;
- Extrações das frações lipídicas;
- Síntese do biodiesel;
- Separação e quantificação do biodiesel.

A Figura 5.1. ilustra o esquema das etapas realizadas durante a execução do trabalho.

Figura 5.1. Fluxograma do desenvolvimento do trabalho

Os resultados do desenvolvimento do trabalho são apresentados e analisados a seguir.

5.1. Determinação da concentração inicial dos cultivos

A fim de padronizar a concentração inicial dos experimentos foi iniciado três cultivos com diferentes concentrações iniciais e acompanhado o desenvolvimento do crescimento celular.

A partir da curva de crescimento obtida por contagem celular do fotobiorreator 1 (concentração inicial foi de $5,5 \times 10^6$ células mL^{-1}), observou-se que o cultivo atingiu uma concentração celular máxima de aproximadamente 18×10^6 células mL^{-1} em 15 dias de acordo com a Figura 5.2.

Figura 5.2. Curva de crescimento do fotobiorreator 1 obtida por contagem celular.

No fotobiorreator 2 (concentração inicial foi de 3×10^6 células mL^{-1}), foi observado a partir da curva de crescimento obtida por contagem celular que o cultivo atingiu uma concentração celular máxima de aproximadamente 16×10^6 células mL^{-1} em 11 dias conforme mostrado na Figura 5.3.

Figura 5.3. Curva de crescimento do fotobiorreator 2 obtida por contagem celular

No fotobiorreator 3 ($0,7 \times 10^6$ células mL^{-1}), foi observado que o cultivo atingiu uma concentração celular máxima de aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células mL^{-1} entre o quarto e o quinto dia de cultivo (Figura 5.4.) antes da ocorrência de

contaminação, evidenciada pela queda no número de população e pela formação de espuma no cultivo.

Figura 5.4. Curva de crescimento do fotobiorreator 3 obtida por contagem celular

Com base nas curvas de crescimento apresentadas acima, foi possível perceber que a concentração inicial mais adequada para o cultivo nesse trabalho é a concentração de 3×10^6 células mL^{-1} utilizada no fotobiorreator 2, que aumentou aproximadamente cinco vezes em relação a sua concentração inicial em 11 dias, enquanto o fotobiorreator 1 que utilizou a concentração inicial de $5,5 \times 10^6$ células mL^{-1} aumentou aproximadamente 3 vezes em relação a sua concentração inicial em 15 dias.

O fotobiorreator 3 que utilizou uma concentração inicial de $0,7 \times 10^6$ células mL^{-1} foi o único entre os três fotobiorreatores que apresentou contaminação, indicando a fragilidade de se utilizar baixas concentrações celulares inicialmente.

Com bases nestes experimentos iniciais, foi eleito o uso de 3×10^6 células mL^{-1} como concentração inicial para os cultivos realizado neste trabalho.

5.2. Determinação da relação entre contagem celular e absorbância

Para acompanhar o crescimento celular de cada cultivo foi realizada a comparação do método de contagem em câmara de Neubauer com o método de

Espectrofotômetro UV/Visível. A Tabela 5.1. abaixo relaciona os volumes das alíquotas retiradas do cultivo microalgal com os valores obtidos pela contagem celular realizada microscopicamente e pela leitura da absorbância.

Tabela 5.1. Valores de contagem celular e absorbância para diferentes concentrações.

Volume de alíquota do meio (mL)	Contagem celular (n° de células/mL)	Absorbância
0	0	0
2,5	2.450.000	0,081
5	4.400.000	0,172
10	8.700.000	0,340
15	12.850.000	0,505
20	17.200.000	0,646
25	22.050.000	0,799

A partir dos dados obtidos pelas análises microscópicas e espectrofotométricas de cada solução de diferente concentração, foi possível plotar a curva analítica relacionando a absorbância e a contagem celular apresentada na Figura 5.5.

Figura 5.5. Curva que relaciona absorbância e contagem celular

Nota-se pelo gráfico e pelo coeficiente de correlação que há uma relação de linearidade entre as leituras de absorbância e contagem celular realizada no microscópio. Segundo Rocha e colaboradores (2003), a contagem celular é um método preciso, porém demorado quando comparado com o método de densidade óptica.

5.3. Planejamento experimental

Visando determinar a influências dos fatores (Luz, NaNO_3 , CO_2 e profundidade) na obtenção e produtividade da biomassa, bem como no acúmulo de lipídeos e produtividade lipídica no cultivo da microalga marinha *Chlorella sp* foi proposto um planejamento experimental, em particular, o arranjo ortogonal de Taguchi (L_8), definindo como variáveis independentes os fatores acima expostos em dois níveis.

Os cultivos/experimentos do planejamento experimental foram realizados em triplicata e a evolução da densidade celular foi acompanhada diariamente utilizando medidas de absorbância e traçada suas respectivas curvas analíticas.

Todos os cultivos do planejamento foram tratados como um processo em batelada, na qual o seu encerramento foi determinado pela ocorrência da fase estacionária da cultura, ou quando em sua ausência, diretamente substituída pela fase de morte.

O cultivo do experimento 1, submetido a intensidade luminosa de 0,85kluz, 5% de CO_2 , $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio no meio de cultivo e 5 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 16 dias conforme observado na Figura 5.6.

Figura 5.6. Curva de crescimento microalgal para o experimento 1.

O cultivo do experimento 2, submetido a intensidade luminosa de 0,85kluz, 5% de CO₂, 0,75 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 10 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 17 dias conforme observado na Figura 5.7.

Figura 5.7. Curva de crescimento microalgal para o experimento 2.

O cultivo do experimento 3, submetido a intensidade luminosa de 0,85kluz, 10% de CO₂, 0,25 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 10 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 14 dias conforme observado na Figura 5.8.

Figura 5.8. Curva de crescimento microalgal para o experimento 3.

O cultivo do experimento 4, submetido a intensidade luminosa de 0,85kluz, 10% de CO₂, 0,75 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 5 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 17 dias conforme observado na Figura 5.9.

Figura 5.9. Curva de crescimento microalgal para o experimento 4.

O cultivo do experimento 5, submetido a intensidade luminosa de 14,5kluz, 5% de CO₂, 0,25 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 10 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 14 dias conforme observado na Figura 5.10.

Figura 5.10. Curva de crescimento microalgal para o experimento 5.

O cultivo do experimento 6, submetido a intensidade luminosa de 14,5kluz, 5% de CO₂, 0,75 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 5 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 14 dias conforme observado na Figura 5.11.

Figura 5.11. Curva de crescimento microalgal para o experimento 6

O cultivo do experimento 7, submetido a intensidade luminosa de 14,5kluz, 10% de CO₂, 0,25 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 5 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 6 dias conforme observado na Figura 5.12.

Figura 5.12. Curva de crescimento microalgal para o experimento 7.

O cultivo do experimento 8, submetido a intensidade luminosa de 14,5kluz, 10% de CO₂, 0,75 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo e 10 cm de profundidade atingiu a densidade celular máxima aos 7 dias conforme observado na Figura 5.13.

Figura 5.13. Curva de crescimento microalgal para o experimento 8.

Nota-se que o experimento 2 atingiu o maior crescimento microalgal, acima de 1,0 de absorbância. Em seguida o experimento 6 também mostrou um bom crescimento microalgal, chegando a absorbâncias maiores do que 0,7. Os experimentos 3 e 4 obtiveram crescimento razoável com absorbâncias máximas

próximas de 0,5 e os de número 1 e 5 chegaram a valores próximos de 0,35 como máximos. Por fim, com o pior crescimento, estão os experimentos 7 e 8 que chegaram a absorvências próximas de 0,3.

5.3.1 Concentração (g.L^{-1}) de biomassa obtida

Após o período de cada cultivo conforme previsto no arranjo ortogonal de Taguchi, efetuou-se a colheita da biomassa por floculação, uma vez que não foi possível realizar a centrifugação da biomassa porque a centrífuga disponível fornecia velocidade de rotação máxima de 3500 rpm, que não foi suficiente para decantar as células. Desse modo, após cada cultivo a biomassa foi floculada, congelada e submetida à liofilização, em seguida media-se a umidade da biomassa para posteriormente ser desconsiderada da massa obtida. Os resultados da concentração mássica de cada experimento encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Repostas em triplicata para a determinação da concentração (g.L^{-1}) de biomassa microalgal.

Experimento	Fatores							Concentração (g.L^{-1})				
	A	B	AB	C	AC	AD	D				Média	S/N
1	1	1	1	1	1	1	1	1,03	0,80	1,10	0,98	-0,46
2	1	1	1	2	2	2	2	3,57	3,65	3,54	3,59	11,09
3	1	2	2	1	1	2	2	1,02	1,30	1,03	1,12	0,79
4	1	2	2	2	2	1	1	2,54	1,06	1,46	1,69	2,97
5	2	1	2	1	2	1	2	0,90	0,90	0,48	0,76	-3,62
6	2	1	2	2	1	2	1	2,59	2,51	2,58	2,56	8,15
7	2	2	1	1	2	2	1	0,59	0,23	0,39	0,40	-9,89
8	2	2	1	2	1	1	2	0,55	0,50	0,48	0,51	-5,85

A partir destes resultados utilizou-se o programa STATISTICA versão 8.0 para a análise da influência dos fatores sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal. Foi possível observar que o fator C (nível 2) se apresentou como o mais significativo, seguido pelos fatores A (nível 1), B (nível 1) e a interação AD favorecendo o aumento da concentração da biomassa conforme apresentado na Figura 5.14.

Figura 5.14. Influência dos fatores sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Para visualizar a influência das interações sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal utilizou-se o programa MINITAB versão 16.0 que possibilita observar o comportamento da variável resposta em função dos ajustes dos níveis dos fatores. A condição de interação entre os fatores pode ser facilmente observada pela quebra do paralelismo entre os segmentos de reta conforme apresentado na Figura 5.15.

Figura 5.15. Influência das interações entre os fatores sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade.

Pela análise de variância (ANOVA), todos os fatores e interações significantes possuem um grau de confiança maior do que 95%, ou seja, o nível de significância dado pelo p-valor é menor do que 0,05. Assim verificou-se que os fatores A, B, C (intensidade luminosa, CO_2 e concentração de NaNO_3) e as interações AC e AD apresentam efeito significativo de acordo com a Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Análise da variância (ANOVA) para a concentração de biomassa microalgal

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	3,694211	1	3,694211	40,2227	0,000010
B	6,504168	1	6,504168	70,8176	0,000000
AB	0,1536	1	0,1536	1,6724	0,214298
C	9,735909	1	9,735909	106,0049	0,000000
AC	0,604203	1	0,604203	6,5786	0,020769
AD	5,206153	1	5,206153	56,6848	0,000001
D	0,046817	1	0,046817	0,5097	0,485536
Residual	1,469503	16	0,091844	-	-

Onde:

SQF: Soma quadrática dos fatores

GL: Grau de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância

O mesmo procedimento utilizando o programa STATISTICA foi feito para analisar a influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído (S/N) da concentração de biomassa microalgal e também foi realizado uma análise de variância (ANOVA).

A análise do planejamento de Taguchi pelo gráfico da influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído da concentração de biomassa microalgal (Figura 5.16) é semelhante à análise anteriormente desenvolvida para a influência dos fatores sobre a variável resposta concentração da biomassa microalgal, apresentando significância para os fatores A, B e C.

Figura 5.16. Influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído da concentração de biomassa microalgal. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Para visualizar a influência das interações sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal utilizou-se o programa MINITAB versão 16.0 que possibilita observar o comportamento da variável resposta em função dos ajustes dos níveis dos fatores. A condição de interação entre os fatores pode

ser facilmente observada pela quebra do paralelismo entre os seguimentos de reta conforme apresentado na Figura 5.17.

Figura 5.17. Influência das interações entre os fatores sobre o sinal ruído para a concentração da biomassa. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade.

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.4, verifica-se que apenas os fatores A, B, C e as interações AB e AD apresentam efeito significativo.

Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a razão sinal/ruído da concentração de biomassa microalgal

	SQF	GL	SMQF	F	p
A	228,687	1	228,687	39,68236	0,000011
B	248,6342	1	248,6342	43,14364	0,000006
AB	71,8179	1	71,8179	12,46204	0,002781
C	297,4808	1	297,4808	51,61964	0,000002
AC	0,2033	1	0,2033	0,03529	0,85336
AD	101,4556	1	101,4556	17,60483	0,000684
D	0,0108	1	0,0108	0,00188	0,96595
Residual	92,207	16	5,7629	-	-

Onde:

SQF: Soma quadrática dos fatores

GL: Grau de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância

As análises realizadas anteriormente demonstram que os fatores significantes para a concentração de biomassa microalgal são os fatores A, B e C, ou seja, intensidade luminosa, CO₂ e concentração de NaNO₃, indicando que o processo possui melhor desempenho quando ajustado a intensidade luminosa em 0,85 klux (fator A, nível 1), com 5% de CO₂ (fator B, nível 1) e 0,75 g.L⁻¹ de nitrato de sódio no meio de cultivo (fator C, nível 2) enquanto a profundidade (fator D) não mostrou-se significativa quanto seu nível de operação.

A intensidade luminosa, a vazão de CO₂ e a concentração de nitrogênio no meio de cultivo foram reportadas como fatores importantes por diversos autores. A luminosidade está diretamente relacionada ao processo de fotossíntese e possui diferentes efeitos nas espécies microalgais, sendo que algumas espécies requerem maior ou menor energia luminosa para conduzir o processo (SUALI; SARBATLY, 2012). O excesso de luminosidade pode causar fotoinibição e morte celular (SANCHEZ, 1996; LOURENÇO, 2006).

Desse modo, as afirmações anteriormente descritas vão de encontro aos resultados observados para o crescimento celular, que indicaram que o nível baixo para a luminosidade favoreceu o crescimento celular e, portanto, a concentração de biomassa microalgal.

O processo de fotossíntese é significativamente relacionado com a concentração de CO₂ no meio de cultivo e cada espécie responde distintamente para diversas concentrações de CO₂ (MORAIS, 2006). De acordo com a análise dos resultados para o crescimento celular baseado nos experimentos realizados, o nível baixo para a vazão de CO₂ favoreceu o crescimento celular.

O nitrogênio é um componente fundamental de três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucleicos 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. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio disponíveis são baixas, verifica-se a diminuição marcante da taxa de divisão celular (LOURENÇO, 2006; WANG *et al.*, 2013).

A análise dos resultados para o crescimento celular baseado nos experimentos realizados apontou que a concentração de NaNO₃ no nível alto (0,75 g.L⁻¹) foi o fator que mais influenciou o crescimento celular.

5.3.2 Produtividade em massa ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)

Com os resultados em concentração mássica de biomassa microalgal obtidos ao final de cada cultivo/experimento foi possível determinar a produtividade em massa dividindo cada valor pelo número de dias de cultivo de cada experimento conforme apresentado pela Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Repostas em triplicata para a determinação da Produtividade em massa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) da biomassa microalgal.

Experimento	Fatores							Produtividade em massa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)				
	A	B	AB	C	AC	AD	D				Média	S/N
1	1	1	1	1	1	1	1	64,38	50,00	68,75	61,04	35,46
2	1	1	1	2	2	2	2	210,00	214,71	208,24	210,98	46,48
3	1	2	2	1	1	2	2	78,46	100,00	79,23	85,90	38,52
4	1	2	2	2	2	1	1	158,75	66,25	91,25	105,42	39,05
5	2	1	2	1	2	1	2	64,29	64,29	34,29	54,29	35,52
6	2	1	2	2	1	2	1	199,23	193,08	198,46	196,92	45,90
7	2	2	1	1	2	2	1	98,33	38,33	65,00	67,22	34,68
8	2	2	1	2	1	1	2	78,57	71,43	68,57	72,86	37,20

A partir destes resultados utilizou-se o programa STATISTICA versão 8.0 para a análise da influência dos fatores sobre a variável resposta produtividade em massa da biomassa microalgal. Foi possível observar que o fator C (nível 2) se apresentou como o mais significativo, seguido pela interação AD e o fator B (nível 1) favorecendo o aumento da produtividade em massa conforme apresentado na Figura 5.18.

Figura 5.18. Influência dos fatores sobre a variável resposta produtividade em massa da biomassa microalgal. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Para visualizar a influência das interações sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal utilizou-se o programa MINITAB versão 16.0 que possibilita observar o comportamento da variável resposta em função dos ajustes dos níveis dos fatores. A condição de interação entre os fatores pode ser facilmente observada pela quebra do paralelismo entre os seguimentos de reta conforme apresentado na Figura 5.19.

Figura 5.19. Influência das interações entre os fatores sobre a variável resposta produtividade em massa da biomassa microalgal. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade.

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.6, verifica-se que o fator C é o mais significativo, seguido pela interação AD e pelo fator B.

Tabela 5.6. Análise da variância (ANOVA) para a produtividade em massa da biomassa microalgal

	SQF	GL	SMQF	F	p
A	1949,4	1	1949,4	4,1168	0,0594
B	13800	1	13800	29,143	6E-05
AB	348,84	1	348,84	0,7367	0,4034
C	37866	1	37866	79,967	0
AC	168,01	1	168,01	0,3548	0,5597
AD	26793	1	26793	56,584	1E-06
D	16,5	1	16,5	0,0349	0,8543
Residual	7576,3	16	473,52		

Onde:

SQF: Soma quadrática dos fatores

GL: Grau de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância

O mesmo procedimento utilizando o programa STATISTICA foi feito para analisar a influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído (S/N) da produtividade em massa da biomassa microalgal e também foi realizada uma análise de variância (ANOVA).

A análise do planejamento de Taguchi pelo gráfico da influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído da produtividade em massa (Figura 5.20) destaca o fator C como o fator mais significativo seguido pela interação AD.

Figura 5.20. Influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído da produtividade em massa microalgal. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Para visualizar a influência das interações sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal utilizou-se o programa MINITAB versão 16.0 que possibilita observar o comportamento da variável resposta em função dos ajustes dos níveis dos fatores. A condição de interação entre os fatores pode ser facilmente observada pela quebra do paralelismo entre os segmentos de reta conforme apresentado na Figura 5.21.

Figura 5.21. Influência das interações entre os fatores sobre o sinal ruído para a produtividade em massa da biomassa. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO₃, D – Profundidade.

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5.7, verifica-se que o fator C é o mais significativo, seguido pela interação AD e pelo fator B.

Tabela 5.7. Análise da variância (ANOVA) para o sinal ruído da produtividade em massa da biomassa microalgal.

	SQF	GL	SMQF	F	p
A	19,648	1	19,648	3,4562	0,0815
B	42,773	1	42,773	7,5242	0,0144
AB	4,4875	1	4,4875	0,7894	0,3874
C	233,65	1	233,65	41,102	9E-06
AC	0,2075	1	0,2075	0,0365	0,8509
AD	147,23	1	147,23	25,9	0,0001
D	0,1552	1	0,1552	0,0273	0,8708
Residual	90,955	16	5,6847		

Onde:

SQF: Soma quadrática dos fatores

GL: Grau de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância

As análises realizadas anteriormente demonstram que os fatores significantes para a concentração de biomassa microalgal são os fatores B e C, ou seja, CO₂ e concentração de NaNO₃, indicando que o processo possui melhor desempenho quando ajustado o CO₂ com 5% (fator B, nível 1) e 0,75 g.L⁻¹ de nitrato de sódio no meio de cultivo (fator C, nível 2) enquanto a intensidade luminosa (fator A) e a

profundidade (fator D) não se apresentaram como significantes quanto ao seus níveis de operação.

5.3.2 Teor de lipídeos

A partir da biomassa liofilizada do experimento 1 do arranjo ortogonal de Taguchi foi realizado um experimento para verificar o método mais eficiente para extrair os lipídeos da biomassa. De acordo com Tabela 5.8 o método modificado de Bligh and Dyer mostrou-se 31,38% mais eficiente do que o método adaptado de Folch utilizando ultrassom de sonda.

Tabela 5.8. Comparação entre métodos de extração de lipídeos

	Método	
	Bligh and Dyer	Folch
Teor (%)	13,53	10,15
	13,73	10,77
	13,85	10,37
Média	13,70	10,43

Determinou-se o teor de lipídeos em triplicata, para cada experimento do arranjo ortogonal de Taguchi utilizando o método modificado de Bligh and Dyer. Os resultados encontram-se na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Repostas em triplicata para a determinação do teor de lipídeos (%)

Experimento	Fatores							Teor lipídico (%)				Média	S/N
	A	B	AB	C	AC	AD	D						
1	1	1	1	1	1	1	1	13,53	13,73	13,85		13,7	22,74
2	1	1	1	2	2	2	2	8,56	7,83	8,21		8,20	18,26
3	1	2	2	1	1	2	2	19,70	20,03	19,54		19,76	25,91
4	1	2	2	2	2	1	1	9,45	8,72	7,73		8,63	18,63
5	2	1	2	1	2	1	2	15,86	17,63	15,15		16,21	24,15
6	2	1	2	2	1	2	1	10,37	12,55	10,71		11,21	20,90
7	2	2	1	1	2	2	1	10,72	13,43	12,81		12,32	21,69
8	2	2	1	2	1	1	2	7,32	9,85	10,22		9,13	18,91

A partir da análise da influência dos fatores sobre a variável resposta teor lipídico utilizando o programa STATISTICA, foi possível observar que o fator C - concentração de NaNO_3 (nível 1), D – profundidade (nível 2) e as interações AB e

AC favoreceram o aumento do teor de lipídeos conforme apresentado na Figura 5.22.

Figura 5.22. Influência dos fatores sobre a variável resposta teor de lipídeos. . A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Para visualizar a influência das interações sobre a variável resposta concentração de biomassa microalgal utilizou-se o programa MINITAB versão 16.0 que possibilita observar o comportamento da variável resposta em função dos ajustes dos níveis dos fatores. A condição de interação entre os fatores pode ser facilmente observada pela quebra do paralelismo entre os seguimentos de reta conforme apresentado na Figura 5.23.

Figura 5.23. Influência das interações dos fatores sobre a variável resposta teor de lipídeos. . A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , G – Profundidade.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que o fator C (concentração de NaNO_3), o fator D (profundidade) e as interações AB, AC e AD apresentam efeito significativo de acordo com a Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Análise da variância (ANOVA) para o teor de lipídeos

	SQF	GL	SMQF	F	p
A	0,7561	1	0,7561	0,7132	0,410822
B	0,0988	1	0,0988	0,0932	0,764073
AB	58,2193	1	58,2193	54,9153	0,000001
C	231,0121	1	231,0121	217,9017	0,000000
AC	26,6704	1	26,6704	25,1568	0,000127
AD	5,434	1	5,434	5,1256	0,037825
D	20,7204	1	20,7204	19,5445	0,000428
Residual	16,9627	16	1,0602	-	-

Onde:

SQF: Soma quadrática dos fatores

GL: Grau de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância

De maneira análoga ao procedimento realizado para a influência dos fatores sobre a variável resposta, determinou-se a influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído (S/N) do teor de lipídeos de acordo com a Figura 5.24 que mostrou-se semelhante à análise anteriormente desenvolvida para a influência dos fatores

sobre a variável resposta teor de lipídeos, apresentando significância para o fator C e interação AB.

Figura 5.24. Influência dos fatores sobre a razão sinal/ruído do teor de lipídeos. A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade, AB – Interação entre os fatores A e B, AC – Interação entre os fatores A e C, AD – Interação entre os fatores A e D.

Para analisar a influência das interações dos fatores sobre o acúmulo de lipídeos utilizou-se o programa MINITAB versão 16.0 observando a quebra de paralelismo entre os segmentos de reta representados por cada fator na Figura 5.25.

Figura 5.25. Influência das interações dos fatores sobre o sinal ruído no acúmulo de lipídeos . A – Intensidade luminosa, B – Dióxido de Carbono, C – Concentração de NaNO_3 , D – Profundidade.

A análise de variância (ANOVA) apresentada pela Tabela 5.11 possibilitou verificar significância com grau de confiança maior do que 95%, ou seja, p-valor menor do que 0,05, para os fatores C e D e as interações AB e AC.

Tabela 5.11. Análise de variância (ANOVA) para a razão sinal/ruído do teor de lipídeos

	SQF	GL	SMQF	F	p
A	0,0645	1	0,0645	0,0893	0,768946
B	0,1593	1	0,1593	0,2205	0,644984
AB	23,1345	1	23,1345	32,0284	0,000036
C	115,6292	1	115,6292	160,0819	0,000000
AC	12,6616	1	12,6616	17,5293	0,000697
AD	1,8015	1	1,8015	2,4941	0,133840
D	4,1241	1	4,1241	5,7096	0,029531
Residual	11,557	16	0,7223	-	-

Onde:

SQF: Soma quadrática dos fatores

GL: Grau de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância

As análises realizadas anteriormente destaca como fator mais significativa a concentração de NaNO_3 (fator C) seguido da profundidade (fator D), além de haver pequenas interação entre os fatores AB, AC e AD.

Desse modo para aumentar o teor lipídico deve-se ajustar a concentração de NaNO_3 no nível baixo ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) e a profundidade no nível alto (10 cm) enquanto os demais fatores (Intensidade luminosa e CO_2) não interferem significativamente quanto o ajuste de seus níveis.

Segundo Praveenkumar e colaboradores, 2012 a privação de nitrogênio estimula o acúmulo de lipídeos, fato observado na análise dos resultados que indicaram que para o acúmulo de lipídeos a concentração de nitrogênio deve operar no nível baixo, enquanto que Lourenço (2006) afirma que cultivos realizados em tanques devem apresentar profundidade inferior a 30 cm para garantir que a luz atinja toda a população de microalgas no cultivo.

A Tabela 5.12 apresenta os resultados obtidos com o planejamento experimental utilizado neste trabalho para as variáveis respostas concentração de biomassa, produtividade lipídica e teor lipídico.

Tabela 5.12. Resultados obtidos neste trabalho utilizando o Arranjo Ortogonal de Taguchi L_8 .

Experimento	Fatores							Concentração de biomassa (g.L ⁻¹)	Produtividade em massa (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Lipídios (%)
	A	B	AB	C	AC	AD	D			
1	1	1	1	1	1	1	1	0,98	61,04	13,7
2	1	1	1	2	2	2	2	3,59	210,98	8,20
3	1	2	2	1	1	2	2	1,12	85,90	19,76
4	1	2	2	2	2	1	1	1,69	105,42	8,63
5	2	1	2	1	2	1	2	0,76	54,29	16,21
6	2	1	2	2	1	2	1	2,56	196,92	11,21
7	2	2	1	1	2	2	1	0,40	67,22	12,32
8	2	2	1	2	1	1	2	0,51	72,86	9,13

Praveenkumar e colaboradores, 2012, realizaram um trabalho para avaliar a influência da privação de nutrientes no acúmulo de lipídeos da microalga marinha *Chlorella sp.*, bem como o impacto na concentração de biomassa obtida e na produtividade em massa, os melhores resultados obtidos para cada variável resposta isoladamente é apresentado na Tabela 5.13 com os do presente trabalho.

Tabela 5.13. Concentração, produtividade em massa e teor de lipídeos obtidos com a microalga *Chlorella sp.*

Concentração (g.L ⁻¹)	Produtividade em massa (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Teor de lipídeos (%)	Fonte
3,59	210,98	19,76	Presente trabalho
2,58	129,00	42,80	Praveenkumar <i>et al</i> (2012)

5.3.3 Otimização do cultivo

Após a análise da influência dos fatores sobre a variável resposta concentração de biomassa (g.L⁻¹) observou-se que a melhor configuração operacional do cultivo deve ser ajustada de modo que seja fornecida uma intensidade luminosa de 0,85 klux (fator A, nível 1), com 5% de CO₂ (fator B, nível 1) e 0,75 g.L⁻¹ de nitrogênio no meio de cultivo (fator C, nível 2) enquanto a profundidade (fator D) pode ser ajustada tanto no nível alto ou baixo que não influenciará na resposta.

Entretanto para aumentar o teor lipídico (%) deve-se ajustar o cultivo a uma concentração de 0,25 g.L⁻¹ de NaNO₃ (fator C, nível 1), e a 10 cm de profundidade (fator D, nível 2) enquanto os demais fatores, Intensidade luminosa (fator A) e CO₂ (fator B) não interferem significativamente quanto o ajuste de seus níveis.

Observando as duas situações, nota-se que o nível de ajuste do fator C (concentração de NaNO₃) que melhor se adequa ao alcance de uma maior concentração de biomassa é diferente do ajuste que visa ao aumento do teor de lipídeos, dificultando a proposta de ajuste que atenda as duas situações conforme mostra a Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Ajuste dos níveis dos fatores sobre o cultivo

Resposta / Nível	Fatores			
	A	B	C	D
Concentração de biomassa	1	1	2	1 ou 2
Teor lipídico	1 ou 2	1 ou 2	1	2
Proposta de ajuste	1	1	?	2

A fim de encontrar uma solução para esse impasse, utilizou-se a ferramenta Desirability do programa MINITAB versão 16.0 que forneceu uma previsão de ajuste que atende aos dois requisitos, alta concentração de biomassa aliado a um alto teor de lipídeos de acordo com a Figura 5.26.

Figura 5.26. Ajuste desejado fornecido pelo programa MINITAB versão 16.0. Codificação: Nível baixo (-1,0), Nível alto (1,0).

Desse modo, o melhor ajuste previsto para o processo, fornecerá a maior concentração de biomassa aliada ao máximo de acúmulo de lipídeos, 2,04 g.L⁻¹ e 15,04% respectivamente, quando ajustados seus fatores em 0,85 Klux de intensidade luminosa, 5% de CO₂, 0,42g.L⁻¹ de NaNO₃ e 10 cm de profundidade de cultivo de acordo com a Tabela 5.15.

Tabela 5.15. Ajuste dos fatores otimizados pela ferramenta Desirability.

Resposta / Nível	Fatores			
	A	B	C	D
Ajuste Desirability	-1	-1	-0,3062	1
Ajuste decodificado	0,85Klux	5%	0,42g.L ⁻¹	10 cm

A experimentação confirmatória do modelo de ajustes previsto pela ferramenta Desirability não foi realizada por falta de tempo hábil durante a realização do mestrado.

5.4 Perfil lipídico

O perfil dos ácidos graxos que compõem o material lipídico extraído da microalga *Chlorella sp.* do presente trabalho apresenta em maior proporção os ácidos oleico (22,84%), palmítico (20,69%) e láurico (17,69%).

Segundo Ramos e colaboradores (2005), altas proporções de ácido palmítico (C16:0) conferem propriedades importantes associadas à boa qualidade do biodiesel como alto índice de cetano, que é uma medida adimensional que indica boa qualidade da ignição do combustível, enquanto que o ácido linolênico (C18:3) quando presente em altas quantidades no material lipídico, pode resultar em um biodiesel propenso a sofrer polimerização dos triacilgliceróis quando submetido á aquecimento elevado, provocando depósitos no motor, propriedade medida pelo índice de iodo. De acordo com recomendações da norma europeia, composições lipídicas com menos do que 12% de ácido linolênico (C18:3) visam atender as especificações para o índice de iodo (KNOTHE, 2005; RAMOS *et al.*, 2009).

A Tabela 5.16. compara o perfil dos ácidos graxos obtidos neste trabalho com outros perfis de microalgas do gênero *Chlorella* e óleo vegetal encontrados na literatura.

Tabela 5.16. Perfil dos ácidos graxos presentes na composição lipídica (%) de diferentes matrizes lipídicas.

Ácido graxo	<i>Chlorella</i> sp. (presente trabalho)	<i>Chlorella</i> sp. (PRAVEENKUMAR, 2012)	<i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i> (FRANCISCO <i>et al.</i>, 2010)	Óleo de Macaúba (CARVALHO <i>et al.</i>, 2013)
Saturado				
C 6:0	0,12	...	0,15	...
C 8:0	8,22	...	0,63	5,40
C 10:0	3,90	0,72	0,54	4,00
C 12:0	17,69	1,23	0,27	36,10
C 14:0	6,25	0,95	1,19	10,20
C 15:0	0,31	1,37	31,81	...
C 16:0	20,69	1,40	2,22	8,70
C 17:0	0,23	...	3,90	...
C 18:0	1,04	1,23	1,06	3,60
C 20:0	0,41	23,27	2,87	...
C 22:0	0,48	0,98	...	...
C 24:0	0,72	7,6	0,54	...
Monoinsaturado				
C 16:1	4,17	0,68	1,36	...
C 17:1	0,09	0,74	31,64	...
C 18:1 trans	4,33	5,84	0,03	...
C 18:1	22,84	4,06	7,98	27,70
C 20:1	0,27	4,04	...	...
Poli-insaturado				
C 18:2	3,93	28,42	0,10	3,40
C 18:3	4,33	3,16	...	...

De acordo com o acima exposto, verifica-se que o perfil lipídico obtido neste trabalho se destaca em relação aos demais perfis apresentados na Tabela 5.16. Desse modo pode-se inferir que o perfil dos ácidos graxos apresenta uma composição satisfatória porque o ácido linolênico (C18:3) representa apenas 4,33%. Em contrapartida, o ácido palmítico (C16:0) encontra-se em 20,69% da amostra lipídica conforme pode ser observado na Figura 5.27.

Figura 5.27. Composição dos ácidos graxos presentes no material lipídico.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que o perfil lipídico obtido com o cultivo da microalga marinha *Chlorella sp* conforme conduzido na experimentação atende a proposta de uma fonte de matéria prima adequada a produção de biodiesel.

5.5. Síntese do biodiesel

A partir do material lipídico obtido foram adotadas as condições descritas no item 4.3.7 (Materiais e métodos) para a síntese do biodiesel e quantificado segundo a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H).

Neste trabalho não houve o intuito de estudar a etapa de síntese do biodiesel, apenas demonstrar que os lipídeos extraídos da microalga marinha *Chlorella sp.* são passíveis de transformação em biodiesel, desse modo utilizou-se a síntese por via química que atingiu uma conversão de 78,4% calculado a partir do espectro da ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel apresentado na Figura 5.28.

Figura 5.28. Ressonância magnética nuclear do biodiesel da microalga *Chlorella sp.*

Tendo em vista que não foi utilizado planejamento para aperfeiçoar a reação de síntese de biodiesel, a conversão obtida pode ser considerada satisfatória, uma vez que, segundo reportado por Ehimem (2010), que utilizou a catálise ácida a 90°C, obteve conversões entre 70 a 92% em biodiesel para a *Chlorella*, enquanto que Lemoes (2011) trabalhando a 100°C na catálise ácida atingiu conversões na faixa de 75,4 a 96,7% com a *Chlorella sp.*

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar que a concentração de NaNO_3 no meio de cultivo se apresentou não apenas como o principal fator dentre os demais utilizados na experimentação, assim como conflitante.

A máxima concentração de biomassa obtida foi de $3,59\text{g.L}^{-1}$ com 8,2% de lipídios quando cultivado sob 0,85klux de intensidade luminosa, 5% de CO_2 , $0,75\text{g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e 10cm de profundidade. Entretanto o maior teor lipídico alcançado foi de 19,76% em $1,12\text{g.L}^{-1}$ de biomassa obtida quando cultivado sob 0,85Klux de intensidade luminosa, 5% de CO_2 , $0,25\text{g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e 10cm de profundidade, indicando que os fatores, intensidade luminosa, CO_2 e profundidade devem ser ajustados em 0,85klux, 5% e 10cm respectivamente tanto para atingir a máxima concentração celular quanto para alcançar o maior teor lipídico, enquanto que o fator NaNO_3 deve ser ajustado em $0,75\text{g.L}^{-1}$ para favorecer a máxima concentração de biomassa e em $0,25\text{g.L}^{-1}$ para alcançar o maior teor de lipídios.

Com a utilização da ferramenta Desirability do programa Minitab versão 16.0 foi possível prever uma otimização dos fatores, solucionando o conflito gerado pelo fator concentração de NaNO_3 e encontrar o melhor ajuste para maximizar a concentração de biomassa e teor lipídico em $2,04\text{g.L}^{-1}$ e 15,04% respectivamente quando ajustados em 0,85klux de intensidade luminosa, 5% de CO_2 , 10cm de profundidade e $0,42\text{g.L}^{-1}$ de NaNO_3 .

O perfil dos ácidos graxos do material lipídico apresentou uma proporção de 60 % entre ácidos graxos saturados, 31,7% entre ácidos monoinsaturados e 8,26 % de ácidos poli-insaturados, dentre os quais se destacam com maiores proporções os ácidos oleico (22,84%) e palmítico (20,69%) contra 4,33% de ácido linolênico apenas, sugerindo uma composição adequada à síntese de biodiesel, confirmada pela reação via catálise ácida atingindo 78,4% de conversão a partir do extrato lipídico obtido do cultivo da *Chlorella sp.*

Desse modo conclui-se que a microalga marinha *Chlorella sp* pode ser considerada uma fonte de matéria-prima promissora para a produção de biodiesel.

7. RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função dos resultados promissores obtidos neste trabalho e a fim de complementar esse estudo, recomenda-se:

- Executar a experimentação confirmatória para o ajuste de otimização proposto pelo Desirability;
- Ampliar a escala de cultivo utilizando o ajuste operacional ideal encontrado neste trabalho;
- Executar um planejamento experimental nas etapas de extração lipídica e de síntese de biodiesel com intuito de melhorar o rendimento em óleo e a conversão em combustível.
- Estudar a reutilização do resíduo da biomassa obtido nas etapas de extração lipídica visando o seu aproveitamento para a síntese de bioetanol.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. L. *et al.* Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.

AMARO, H. M.; CATARINA GUEDES, A.; XAVIER MALCATA, F. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, 2011.

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

AY, F.; CATALKAYA, E.C.; KARGI, F. A statistical experiment design approach for advanced oxidation of Direct Red azo-dye by photo-Fenton treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 230-236, 2009.

BABEL, S.; TAKIZAWA, S.; OZAKI, H. Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1193-1202, 2002.

BARRADO, E.; VEGA, M.; GRANDE, P.; DEL VALLE, J.L. Optimization of a purification method for metal-containing wastewater by use of a Taguchi experimental design. **Water Research**, v. 30, p. 2309–2314, 1996.

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

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Biotechnologia Industrial**. Fundamentos, 1ª edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001;

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, n. 2, p. 557-577, 2010.

BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. **Como Fazer Experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 401p. 2010.

CARVALHO, A.K.F. ; DA RÓS, P.C.M. ; TEIXEIRA, L.F. ; ANDRADE, G.S.S.; ZANIN, G.M. ; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485-493, 2013.

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.

CHEN, Y.-H.; WALKER T. H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. **Biotechnology Letters**, 33, 1973-1983. 2011.

CHIANG, Y. M.; HSIEH, H.H. The use of the Taguchi method with grey relational analysis to optimize the thin-film sputtering process with multiple quality characteristic in color filter manufacturing. **Computers & Industrial Engineering**, v. 56, p. 648-661, 2009.

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

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas, **Vetor**, v. 12, p.61 – 78, 2002.

DA RÓS, PATRÍCIA CAROLINE MOLGERO. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica**. 2012. 175p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2012.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; USHA RANI, M.; SHAMALA, T.R.; RAVISHANKAR, G. A. Autotrophic cultivation of *Brotiococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 87-93, 2007.

DE GODOS, I., H. O.; GUZMAN, R.; SOTO, P. A.; GARCIA-ENCINA, E.; BECARES, R. MUNOZ; VARGAS V. A.. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.102, p. 923-927, 2011.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 2738-2749, 2010.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 163-170, 2011.

D'OCA, M.G.M.; HAERTEL, P.L.; MORAES, D.C.; CALLEGARO, F.J.P.; KURZ, M.H.S.; PRIMEL, E.G.; CLEMENTIN, R.M.; MORÓN-VILLARREYES, J.A. Base/acid-catalyzed FAEE production from hydroxylated vegetable oils. **Fuel**, v. 99, p. 912–916. 2011.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. **Fuel**, v. 89, p. 677-684, 2010.

FALKOWSKI, P. G. Photosynthesis: the paradox of carbon dioxide efflux. **Current Biology**, v.7, n.10, p.637-639, 1997.

FRANCISCO E.C. ; NEVES, D. B. ; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration,

lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

FRANK, E. D.; HAN, J.I.; PALOU-RIVERA, A.; ELGOWAINY ; WANG, M. Q. Methane and nitrous oxide emissions affect the life-cycle analysis of algal biofuels. **Environmental Research Letters**, v.7, 2012.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS_A, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p.10–16, 2012.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challengers. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p. 703-726, 2010.

GRIMA, E. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-247, 1999.

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. 1975. p. 29-60.

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M.K.; WEBLEY, P.A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 102 p. 178–85. 2011.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.1037-1047. 2010.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgais biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1079-1084, 2011

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina**: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, GU. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010

HUNTLEY, M.E.; REDALJE, D.G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 12, p. 573-608, 2007.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W.. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

JACOB-LOPES, E., LACERDA, L.M.C.F., FRANCO, T.T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, n.40, p.27-34, 2008.

JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E. A.; EMBIRUCU, M.; GHIRARDI, M. L.. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1406-1413, 2010.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYA, T. W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester: **Fuel**, v. 82, p. 971-975, 2003.

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

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; **Manual de biodiesel**. Edgard Blucher: São Paulo, 2006;

LAL, R. Carbon sequestration. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 363, p. 815-830, 2008.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J.. Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 88, p. 988-996. 2010.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Sao Paulo: Savier, 1990. p.532.

LEMOES, JULIANA SILVA. **Síntese de Ésteres Graxos de Chlorella sp. utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação *in situ***. 2011. 70 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Química de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, 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.

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

LOURENCO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVIN, P. L.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **Eur. J. Phycol.**, v. 39, p. 17-32, 2004.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 217-232, 2010.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technol**, v.97, p. 841-846, 2006.

MIRANDA, J. R. P. G. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011, 130p. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. 2006. Dissertação (Mestre). Universidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2006;

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B.. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, p. 2799-2815, 2006.

MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F.. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 57-70, 2011.

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.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; AKBARSHA, M. A.; THAJUDDIN, N. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008. Evaluation for biodiesel production: **Biomass & Bioenergy**, v. 37, 2012.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; Lima, U. A.; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1987, p. 71.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

ROCHA, J.; GARCIA, J.; HENRIQUES, M. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 237-242, 2003.

ROSA, J. L.; ROBIN, A.; SILVA, M.B.; BALDAN, C. A.; PERES, M. P. Electrodeposition of copper on titanium wires: Taguchi Experimental Design Approach. **Journal of Materials Processing Technology**, p. 1181-1188, 2009.

ROSSI, F. Blending Response Surface Methodology and Principal Components Analysis to Match a Target Product. **Food Quality and Preference**, v. 12, p. 457-465, 2001.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura.** 2011. 111p. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

SANCHEZ, J. L. G.; PEREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M., Optimization of light and temperature for growing *Chlorella* sp using response surface methodology. **Biotechnology Techniques**, v. 10, p. 329-334, 1996.

SHARMA, P.; VERMA, A.; SIDHU, R. K.; PANDEY, O. P. Process parameter selection for strontium ferrite sintered magnets using Taguchi L9 orthogonal design. **Journal of Materials Processing Technology**, p.147-151, 2005.

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.

SPOLAORE, P.; C. JOANNIS-CASSAN;; DURAN, E.; ISAMBERT, A.. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1049-1056, 2006.

SUALI, E. & R. SARBATLY. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, 2012.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SUN, H.; DING, Y.; DUAN, J.; ZHANG, Q.; WANG, Z.; LOU, H.; ZHENG, X. **Bioresource Technol**, 101, p. 953-958, 2010.

TAGUCHI, G.; KONISHI, S. **Taguchi methods**: orthogonal arrays and linear graphs. American Supplier Institute, 1987.

TAKAGI, M.; KARSENIO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.3, p.101-223, 2006.

VAN GYSEGHEM,E.; JIMIDAR, M.; SNEYERS, R.; REDLICH, D.; VERHOEVEN, E.; MASSART, D.L.; VANDER HEIDEN, Y. Selection of reversed-phase liquid chromatographic columns with diverse selectivity towards the potential separation of impurities in drugs. **Journal of Chromatography A**, n. 1042, p. 69-80, 2004.

VERMA, N. M.; MEHROTRA, SHAKTI.; SHUKLA, A.; MISHRA, B. N. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 10, p 1402-1411, 2010.

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A., ed. **Spirulina platensis (Arthrospira)**: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. p.43-66.

XU, L.; WEATHERS, P. J.; XIONG, X. R.; LIU, C.Z.. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 178-189. 2009.

WANG, C.; YU, X.; LI H.; YANG, J. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. **Journal of Environmental Biology**, v. 34, p. 421-425, 2013.

WANG, T. Y.; HUANG, C.Y. Improving forecasting performance by employing the Taguchi method. **European Journal of Operational Research**, p. 1052-1065, 2007.

WEN, Z. Y; F. CHEN. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 273-294. 2003.

WU, F. C. Optimization of correlated multiple quality characteristic using desirability function. **Quality Engineering**, v. 17, n. 1, p. 119-126, 2005.

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 & Manufacture**, v.42, p. 1203–1212, 2002.

YEN, H. W.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology**, n.98, p.130-134, 2007.

ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; PURUHITO, E.; CHEN, Y.. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5297-5304.,2010.