

Carla Cristina Almeida Loures

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CULTIVO DA MICROALGA
CHLORELLA MINUTISSIMA COMO FONTE DE MATÉRIA-PRIMA PARA A
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Guaratinguetá

2016

CARLA CRISTINA ALMEIDA LOURES

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CULTIVO DA MICROALGA
CHLORELLA MINUTISSIMA COMO FONTE DE MATÉRIA-PRIMA PARA A
PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia do Campus de Guaratinguetá,
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do título de Doutor em Engenharia
Mecânica na área de Gestão e Otimização.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcela Aparecida Guerreiro Machado

Guaratinguetá

2016

M892o Loures, Carla Cristina Almeida
Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutíssima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel / Carla Cristina Almeida Loures – Guaratinguetá, 2016
153 f.: il.
Bibliografia: f. 128-142

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva
Co-Orientadora: Profa. Dra. Marcela Aparecida Guerreiro Machado

1. Biodiesel. 2. Microalga. 3. Planejamento experimental. Título

CDU 662.7(043)

CARLA CRISTINA ALMEIDA LOURES

ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA”

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: GESTÃO E OTIMIZAÇÃO

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. José Antonio Perrella Balestieri
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. MESSIAS BORGES SILVA
Orientador/UNESP


Prof. Dr. ELIANA VIEIRA CANETTIERI
UNESP-FEG


Prof. Dr. RONNEY ARISMEL MANCEBO BOLOY
CEFET


Prof. Dr. FABRÍCIO MACIEL GOMES
EEL/USP


Prof. Dr. PATRÍCIA CAROLINE MOLGERO DA RÓS
EEL/USP

Julho de 2016

DADOS CURRICULARES

CARLA CRISTINA ALMEIDA LOURES

NASCIMENTO	03.07.1973 – Juiz de Fora – MG – Brasil
FILIAÇÃO	Nivaldo José Loures Maria José de Almeida Loures
2002/2007	Engenharia Industrial Química Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo - USP.
2008/2011	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química , nível de Mestrado, na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo - USP.
2012/2016	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, nível de Doutorado, na Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Rogerio e filhos Iago e Igor. Dedico a vocês este trabalho como forma de compensar um pouco das horas que me afastei do vosso convívio, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos e por terem acreditado na realização deste grande desafio e sonho em minha vida.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver."

Martin Luther King

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, pela sua presença constante em minha vida e a Nossa Senhora Aparecida eu vos consagro os meus trabalhos, sofrimentos, alegrias e toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Messias Borges Silva, pela orientação e aprendizado ao longo destes anos.

À Prof. Dra. Marcela Ap. Guerreiro Machado pela amizade, apoio e confiança.

Aos professores da FEG-UNESP e aos funcionários do Departamento de Produção que com muita dedicação colaboram com as atividades de ensino e apoio ao ensino.

Aos funcionários da Biblioteca da FEG-UNESP pela dedicação, presteza e principalmente pela vontade de ajudar, em especial a minha amiga Rosana Maciel.

Aos companheiros, especialmente ao Msc. Mateus de Souza Amaral, Juliana Laiate, Eduardo Breda, Guilherme, Saviene, Ítalo, Bruno e a todos os alunos de Iniciação científica do laboratório de meio ambiente da Escola de Engenharia de Lorena.

As professoras, Dra. Heizir de Castro Ferreira, Dra. Daniela Guimaraes e ao professor Dr. Felix Monteiro do departamento de Engenharia química, a Professora Dra. Maria Bernadete de Medeiros do departamento de biotecnologia, pelo constante apoio ao longo da pesquisa.

Ao Departamento de engenharia química, especialmente ao Chico, Cheiza, Bia Mariana, meu muito obrigada por tudo que vocês proporcionaram para que esta pesquisa fosse concluída.

Aos funcionários da oficina Mecânica, elétrica e Departamento de transporte da EEL-USP, pela dedicação e vontade de ajudar, em especial ao Senhor Adilson.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, devido ao fornecimento da microalga para o desenvolvimento da pesquisa.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e CNPQ pelo suporte financeiro.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

LOURES, C.C.A. Otimização do processo de cultivo da microalga chlorella minutissima como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel 2016. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com a microalga *Chlorella minutissima* com o objetivo de determinar as melhores condições operacionais de fotobioreatores tubulares descontínuos, tipo coluna de bolhas, para o crescimento celular e a produção de lipídeos em função das variáveis de processo: fluxo de CO₂ na alimentação, concentração inicial de nitrato, concentração inicial de fosfato, suplementação (metais e vitaminas), temperatura e salinidade. Os experimentos foram planejados utilizando a metodologia de Taguchi. Os resultados obtidos mostraram que a configuração do fotobioreatores tubulares descontínuos, tipo coluna de bolhas, foi adequada para o cultivo da microalga *Chlorella minutissima*, apresentando bons resultados de teor de lipídeos, da ordem de $37,08 \pm 1,50$ % em relação à biomassa seca ao final de 7 dias de cultivo. Definidas as condições ótimas de cultivo foi realizada uma reação como o óleo obtido, empregando catalisador químico (H₂SO₄). O resultado obtido demonstrou que o catalisador atuou de forma eficiente, convertendo os ácidos graxos em seus respectivos ésteres de etila. Outro fator importante de ressaltar foi a ausência de pigmentos presente no material lipídico, visto que o óleo extraído apresentou coloração amarelada similar aos óleos vegetais tradicionais, como por exemplo, o óleo de soja. Pigmentos quando presentes no material lipídico podem comprometer a conversão dos triglicerídeos em ésteres alquílicos (biodiesel). *Chlorella minutissima* apresenta vantagens adicionais perante a diversas matérias-primas lipídicas com presença de pigmentos. Para a avaliação da velocidade de crescimento populacional das microalgas foi considerado o modelo cinético de crescimento logístico. A partir desta investigação, verificou-se que o crescimento celular e a produtividade de lipídeos são significativamente dependentes da concentração inicial de nitrato, do fluxo de dióxido de carbono, da concentração de fosfato, da suplementação do meio e da temperatura. Os melhores valores obtidos, tanto para o crescimento quanto para a produtividade de lipídeos, foram para a concentração de nitrato no nível alto e os demais parâmetros significativos no nível baixo. Dessa forma, a metodologia e os resultados apresentados neste trabalho podem ser úteis na busca pela viabilização econômica da produção de biodiesel de microalgas, uma vez que a produção de biodiesel via microalgas ainda é um processo inviável devido aos custos.

PALAVRAS-CHAVE: Microalgas; *Chlorella minutissima*; Fotobiorreator; Biodiesel
Planejamento de Experimentos; Modelagem.

LOURES, C.C. A. 153f. Process optimization of cultivation of microalgae *Chlorella minutissima* as a raw material source in the production of biodiesel Thesis (Doctorate in Mechanical Engineering) – Energy Department, Engineer Faculty of Guaratinguetá, São Paulo State University, 2016.

ABSTRACT

The current work was developed with the microalgae *Chlorella minutissima* with the aim of determining the best operational conditions of discontinuous-tubular photobioreactors, bubble-column type, to the cell growth and production of lipids in relation to process variables: CO₂ feed flow rate, nitrate initial concentration, phosphate initial concentration, supplements (metals and vitamins), temperature and salinity. The experiments were designed using Taguchi methodology. Results showed that the configuration of discontinuous-tubular photobioreactors, bubble-column type was adequate to the cultivation of microalgae *Chlorella minutissima*, presenting good results in terms of lipid content, of order of $37.08 \pm 1.50\%$ in relation to the dry biomass at the end of the 7 cultivation days. Once optimal cultivation conditions were established, a reaction with obtained oil was carried out using a chemical catalyst (H₂SO₄). Results showed that the catalyst acted in an efficient way, converting fatty oils in its respective ethyl esters. Another important factor worth noticing was the absence of pigments present in the lipid material, considering that the extracted oil presented a yellow color similar to traditional vegetal oils, such as soy oil. The presence of pigments in the lipid content may compromise the conversion of triglycerides in alkyl esters (biodiesel). *Chlorella minutissima* presents additional advantage in comparison to diverse lipid raw materials with the presence of pigments. The logistic growth was used as the kinetic model to evaluate the growth rate and speed of microalgae. From this analysis, it was possible to verify that cell growth and the productivity of lipids were significantly dependent on the initial concentration of nitrate, carbon dioxide flow rate, concentration of phosphate, supplementation of media and temperature. Best values obtained for growth as well as for lipid productivity were nitrate concentration in the high level and the other parameters were significant in the low level. Thus, the methodology and results presented in this work can be useful in seeking economic feasibility of production of microalgae biodiesel, since the production of biodiesel is currently is not viable due to the high costs associated to it.

KEY WORDS: Microalgae; *Chlorella minutissima*; Photobioreactor; Biodiesel; Design of Experiments; Modeling.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1-1 Publicações com relação a utilização de Microalga para produzir Biodiesel.....	30
Figura 1-2 Gráfico de pizza para áreas das publicações de Microalgas x Biodiesel.....	31
Figura 2-1 Representação esquemática da reação global de transesterificação	35
Figura 2-2 Processo conceitual da produção de biodiesel.....	40
Figura 2-3 Microalgas: potenciais matérias-primas para aplicações comerciais	41
Figura 2-4 Grupos mais abundantes de microalgas.....	44
Figura 2-5 Composição Microalgas.....	45
Figura 2-6 Microalga <i>Chlorella minutíssima</i>	48
Figura 2-7 Variação da biomassa numa cultura em modo batelada	50
Figura 2-8 Imagem de dois tipos de tanques abertos “ <i>Circular pond</i> ” e “ <i>raceway pond</i> ”	52
Figura 2-9 Processos de conversão de bicomcombustíveis.....	59
Figura 2-10 Representação das principais fases para implementação DOE FASES	61
Figura 2-11 Fatores influentes em um processo.....	62
Figura 2-12 Pseudocódigo do algoritmo de Nelder Mead Simplex	71
Figura 3-1 Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na pesquisa.....	73
Figura 3-2 A- Desenho esquemático do cepário. B- Imagem dos frascos para manutenção da cepa. C- Imagem do cepário.	75
Figura 3-3 Desenho esquemático do fotobiorreator do tipo coluna de bolhas	77
Figura 3-4 Imagem do sistema de fotobiorreatores	77
Figura 3-5 Biomassa floculada e filtrada.....	79
Figura 3-6 Esquema utilizado na ruptura das células obtenção do óleo.....	80
Figura 3-7 Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ¹ H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos.....	82
Figura 3-8 Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do n+1.....	83
Figura 3-9 Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio do CH ₂ etoxílico dos ésteres etílicos.....	83
Figura 3-10 Esquema reacional de síntese do biodiesel.	84
Figura 3-11 Fluxograma das fases de execução do planejamento de experimentos no meio de cultivo da <i>C. minutíssima</i>	85
Figura 4-1 Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho experimental....	91

Figura 4-2 Efeito dos fatores sobre a média da variável resposta concentração celular (Biomassa).....	94
Figura 4-3 Comportamento da concentração celular em relação à razão S/N.....	97
Figura 4-4 Efeito dos fatores sobre a média da variável resposta Teor de lipídeos (% Óleo) .	99
Figura 4-5 Comportamento do Teor de lipídeos em relação à razão S/N	102
Figura 4-6 Gráfico para a análise conjunta segundo proposto pelo método Desirability.....	103
Figura 4-7 Gráficos de ajuste e de resíduos obtidos pela regressão não linear do modelo logístico aos dados experimentais para o experimento 1	106
Figura 4-8 Gráficos de probabilidade normal dos resíduos e de distribuição dos resíduos para a velocidade máxima de crescimento em função da concentração de nitrato e para a concentração máxima de microalgas em função da temperatura.	108
Figura 4-9 Gráficos de efeitos principais para as médias e para as razões sinal-ruído (SN) para a velocidade máxima de crescimento e para a concentração máxima de células.....	109
Figura 4-10 . Simulação da concentração de células (X) e da produtividade em células (Px) em função do tempo para os experimentos realizados no reator de 18 L.....	111
Figura 4-11 Gráficos de resíduos e de probabilidade normal para a concentração máxima de microalgas em função da concentração de nitrato e os gráficos de efeitos para as médias e para a razão sinal-ruído	114
Figura 4-12 Material lipídico (óleo) obtido da microalga <i>Chlorella minutissima</i>	115
Figura 4-13 Gráfico da viscosidade em função da taxa de deformação	119
Figura 4-14 Curva de decomposição térmica (TGA)	121
Figura 4-15 Ressonância magnética nuclear do biodiesel da microalga marinha <i>Chlorella minutissima</i>	123

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1-1 Representação das taxas de ocorrências das palavras-chave envolvidas na pesquisa realizada na base de dados Scopus.	25
Tabela 2-1 Potencial de produção de óleo e biodiesel de diversas fontes Oleaginosas	37
Tabela 2-2 Composição química de algumas microalgas	46
Tabela 2-3 Espécies produtoras de lipídeos e suas respectivas porcentagens em relação a massa seca.	47
Tabela 3-1 Síntese do biodiesel da microalga chlorella.	74
Tabela 3-2 Parâmetros de controle e níveis usados para seleção das variáveis significativas no cultivo da microalga <i>C. minutissima</i> , utilizando a matriz L8 de Taguchi.....	86
Tabela 3-3 Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L ₈	86
Tabela 4-1 Resultados obtidos para concentração celular (Biomassa) e teor de lipídios.....	92
Tabela 4-2 Análise da variância para Biomassa em relação à média Reator 18 L.....	95
Tabela 4-3 Análise da variância para Biomassa em relação à média Reator 44L.....	96
Tabela 4-4 Análise da variância para Biomassa em relação ao S/N Reator 18L	98
Tabela 4-5 Análise da variância para Biomassa em relação ao S/N Reator 44L	100
Tabela 4-6 Análise da variância para % Óleo em relação à média reator de 18 L.....	100
Tabela 4-7 Análise da variância para % Óleo em relação à média reator de 44L.....	102
Tabela 4-8 Análise da variância para % Óleo em relação ao S/N Reator 18 L.....	102
Tabela 4-9 Análise da variância para % Óleo em relação ao S/N Reator 44L.....	103
Tabela 4-10 Comparação dos valores Reais com o Predito	104
Tabela 4-11 Resultados da regressão não linear do modelo logístico aos dados experimentais.....	105
Tabela 4-12 Resultados da análise da variância dos efeitos sobre as variáveis de resposta...	107
Tabela 4-13 Resultados obtidos pelo experimento 9, proposto a partir dos resultados obtidos pelo método de Taguchi	110
Tabela 4-14 Valores de produtividade máxima estimada para os experimentos realizados no reator de 18 litros.....	112
Tabela 4-15 Análise da variância (ANOVA) dos efeitos sobre a produtividade máxima	113
Tabela 4-16 Perfil de ácidos graxos (%) de diferentes micro-organismos oleaginosos e óleo de palma	116
Tabela 4-17 Índice de acidez e teor ácidos graxos livres das microalgas <i>Chlorella minutissima</i> e <i>Chlorella</i> sp. e da cianobactéria <i>Trichormus</i> sp.	117

Tabela 4-18 Comparação dos valores de viscosidade absoluta (cP) de diferentes fontes de matérias-primas lipídicas empregadas na produção de biodiesel	120
Tabela 4-19 Comparação na produção de Biomassa e Lipídios obtidas de diferentes linhagens de Chlorella.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-1 Classificação da pesquisa.....	29
Quadro 2-1 Comparação de biocombustíveis das três gerações com produtos derivados do petróleo.....	39
Quadro 2-2 Classificação dos grupos de microrganismos fotossintéticos	44
Quadro 2-3 Classificação microalgas conforme cor e Grupo.....	43
Quadro 2-4 Características das condições de cultivo.....	49
Quadro 2-5 Vantagens e limitações de sistemas aberto e fechado.....	53
Quadro 2-6 Utilização de diversos fotobiorreatores no cultivo de microalgas	57
Quadro 2-7 Vantagens e desvantagem dos métodos de colheita de.....	58
Quadro 2-8 Síntese do biodiesel da microalga <i>Chlorella minutissima</i>	60
Quadro 2-9 Características fundamentais do Método de Taguchi.....	63
Quadro 2-10 objetivos de otimização no Método de Derringer.....	67
Quadro 2-11 Relações de importância entre o Alvo e os Limites no Desirability.....	68

LISTAS DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

POAs	Processos oxidativos avançados
DQO	Demanda química de oxigênio
DOC	Carbono Orgânico dissolvido
ZnO	Oxido de Zinco
UV	Ultravioleta
λ	<i>Comprimento de onda</i>
TOC	Carbono orgânico total
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>C. minutissima</i>	<i>Chlorella minutissima</i>
v/v	Volume por volume
V _{vm}	Volume de ar por volume de meio por minuto
TGA	Análise Termogravimétrica
DOE	Design of Experiment
MSR	Método de superfície de resposta
ANOVA	Análise da variância
S/N	Sinal /Ruído
SN	Razão Sinal Ruído
X_{max}	Concentração máxima de células no meio de cultivo.
μ_{max}	Velocidade máxima de crescimento
X_0	Concentração inicial de microalgas
P_x	Produtividade de células
P_L	Produtividade de lipídeos
T	Tempo de cultivo.
T_7	Teor de lipídeos após 7 dias
cP	Centipoise
Gt	Giga Tonelada
tep	tonelada equivalente de petróleo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS E CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	22
1.2	Problemas da Pesquisa.....	26
1.3	Justificativa e Importância.....	26
1.4	Objetivo.....	28
1.4.1	Objetivo Geral....	28
1.4.2	Objetivos Específicos	28
1.5	Tema.....	28
1.6	Método de Pesquisa.....	28
1.7	Delimitações do Trabalho.....	30
1.8	Contribuições.....	30
1.9	Estrutura do Trabalho.....	32
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1	Cenário energético atual.....	33
2.2	Biocombustíveis como uma alternativa aos combustíveis fósseis.....	35
2.2.1	Matérias-primas lipídicas para produção de biodiesel	36
2.3	Biocombustíveis a partir de microalgas.....	40
2.3.1	Processo conceitual para a produção de biocombustível de uma biorefinaria a partir da biomassa microalgal.....	40
2.4	Microalgas Uma abordagem Geral.....	42
2.4.1	Classificação dos microrganismos fotossintéticos	42
2.4.2	Composição das microalgas	45
2.4.3	Reprodução.....	49
2.5	<i>Chlorella minutíssima</i>	49
2.6	Classificação quanto ao Metabolismo.....	50
2.7	Sistema de cultivo.....	50
2.8	Cultivo de microalgas.....	52

2.8.1 Fotobiorreator.....	53
2.9 Colheita da biomassa.....	58
2.10 Extração de lipídeos.....	59
2.11 Processo de conversão para produção de biocombustíveis.....	59
2.12 Produção de biodiesel.....	60
2.13 Planejamento de Experimentos (DOE – <i>Design of Experiment</i>).....	61
2.14 Método de Taguchi.....	62
2.14.1 Razão Sinal/Ruído	64
2.14.2 Menor é o Melhor	64
2.14.3 Maior é o Melhor	65
2.14.4 Nominal é o Melhor.....	65
2.15 Otimização.....	67
2.15.1 Função <i>DESIRABILITY</i>	68
2.15.2 ALGORITMO NELDER-MEAD SIMPLEX.....	71
3 MATERIAL e MÉTODOS	74
3.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	75
3.1.1 Linhagem da microalga	75
3.1.2 Reagentes.....	75
3.1.3 Manutenção da cepa	76
3.1.4 Construção do fotobiorreator do tipo coluna de bolhas	77
3.1.5 Método de desinfecção da água e dos fotobiorreatores	79
3.1.6 Colheita da biomassa	79
3.1.7 Determinações analíticas	80
3.1.7.1 Determinação da biomassa por turbidimetria e contagem celular.....	79
3.1.7.2 Determinação de lipídios totais.....	79
3.1.7.3 Determinação do peso seco.....	80
3.1.7.4 Análise do perfil de ácidos graxos.....	80
3.1.7.5 Determinação da Viscosidade.....	81
3.1.7.6 Análise termogravimétrica (TGA).....	81
3.1.7.7 Síntese e Quantificação do Biodiesel.....	81
3.2 Métodos Matemáticos.....	86

3.3 Planejamento de experimentos (DOE).....	87
3.3.1 O método de Taguchi (arranjo ortogonal L8).....	87
3.3.2 Função “ <i>desirability</i> ”.....	88
3.4 Modelagem e simulação.....	88
3.4.1 Modelo logístico.....	89
3.4.1.1 Cinética de crescimento.....	88
3.4.1.2 Cinética de produção de lipídeos.....	89
3.4.1.3 Produtividade em células.....	89
3.4.1.4 Produtividade em lipídeos.....	90
3.4.1.5 Melhores valores para os parâmetros de processo.....	90
3.4.2 Método de Nelder Mead simplex.....	91
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4.1 Variável Resposta concentração celular (Biomassa).....	95
4.1.1 Comportamento da concentração celular (g/l) em relação à Média.....	95
4.2 Variável Resposta Teor de Lipídeos (%).....	100
4.2.1 Comportamento do Teor de lipídeos em relação à Média.....	100
4.3 Otimização com a função <i>desirability</i>	104
4.4 Cinética de Crescimento.....	106
4.4.2 Efeitos Principais.....	108
4.4.3 Otimização da produtividade em células.....	112
4.5 Caracterização da matéria-prima lipídica obtida da microalga <i>C. minutissima</i> cultivada no fotobiorreator construído.....	116
4.5.1 Perfil de ácidos graxos e Teor de Ácidos graxos livres (FFA).....	116
4.5.2 Estudo reológico.....	119
4.5.3 Análise Termogravimétrica (TG).....	122
4.5.4 Síntese do biodiesel.....	123
5 CONCLUSÃO.....	125
5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	127
5.1.1 Quanto aos Métodos Matemáticos:.....	127
5.1.2 No que diz respeito ao fotobiorreator desenvolvido:.....	127
5.1.3 Em relação ao cultivo da microalga:.....	127

5.1.4 Quanto à obtenção de energia:.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
6 APÊNDICE (A) - MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)	144
Método de superfície de Resposta	147
7 APÊNDICE (B) - COEFICIENTES PARA O MODELO LINEAR	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS E CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

O aumento da população é uma das razões que tem levado a uma crescente demanda de energia no mundo. Logo, a procura por fontes energéticas renováveis e viáveis economicamente cresce cada vez mais na sociedade atual, devido às tendências no aumento de emissões de gases provenientes de combustíveis fósseis, em especial o dióxido de carbono (CO₂). Este vem ocasionando drásticas alterações climáticas devido ao aquecimento global que é proporcionado pelo seu acúmulo e são causadores do efeito estufa na atmosfera, bem como um aumento na demanda e preço do diesel e também pela diminuição de reservas fósseis, pois o consumo de petróleo é 10⁵ vezes mais rápido do que a natureza pode criar. Diante disso, existe uma tendência mundial para a busca de combustíveis mais limpos, e novas fontes de energia que possuam baixa emissão de carbono como a energia solar, térmica, fotovoltaica, hidrelétrica, geotérmica, eólica e biocombustíveis. (NETRAVALI e CHABBA,2003; MUTANDA et al., 2011; NEJAT et al., 2015)

Os biocombustíveis são combustíveis com origem em biomassa renovável, e podem substituir totalmente ou parcialmente os combustíveis derivados do petróleo, além disso, não contribuem para o acúmulo de gases de efeito estufa na atmosfera. Os gases gerados na sua queima são reabsorvidos no crescimento da safra seguinte, trazendo um equilíbrio entre a emissão e a absorção de poluentes. Nesse sentido, a busca por combustíveis alternativos de fontes renováveis vem se tornando cada vez mais atrativo em escala mundial. Diante desses fatores os biocombustíveis poderão se tornar mais competitivos no mercado global de energia. (SAMIMI; ZARINABADI, 2012)

Uma alternativa promissora à substituição dos combustíveis fósseis são os biocombustíveis provenientes de biomassa microbiana, (MUBARAK et al., 2015), que compreendem a terceira geração de matérias-primas empregadas na obtenção de biodiesel. As microalgas, que são organismos microscópicos fotossintéticos encontrados em ambientes marinhos e de água doce, têm se destacado perante os outros microrganismos que fazem parte dessa classe, devido ao seu potencial de acúmulo de material lipídico, onde os principais componentes da fração lipídica são os triglicerídeos e ácidos graxos livres que pode ser

convertido em biodiesel além de apresentar elevada taxa de crescimento e maior eficiência fotossintética, bem como na biomitigação de CO₂ (TAN et al., 2015; ZHU, 2015).

O CO₂ emitido pela queima do biocombustível é sequestrado da atmosfera para a formação de nova biomassa, neutralizando assim as emissões resultantes da combustão do biocombustível diminuindo os efeitos do aquecimento global. Cada quilograma de biomassa algal representa aproximadamente a fixação de 1,83 quilograma de CO₂ (BRENNAN ; OWENDE, 2010). (AMIN, 2009; CHISTI, 2007; IPCC, 2007; WANG et al., 2008). Segundo (BELBUTE ; PEREIRA, 2015) no ano de 2015 foram emitidos aproximadamente 37 Gt de CO₂ na atmosfera terrestre, levando a uma projeção de que no ano de 2100 serão emitidos cerca de 50Gt de CO₂. Por esse motivo, muitos estudos vêm sendo conduzidos para desenvolvimento de uma tecnologia ambientalmente e economicamente viável para produção de combustíveis como alternativa ao petróleo (ZHU, 2015) .

As vantagens para a produção de biocombustíveis, que utilizam como fonte as microalgas, são amplas quando comparadas a outros cultivos, como por exemplo, a cana-de-açúcar e a soja, pois as microalgas apresentam: alta produtividade, as algas depende apenas de luz, nutrientes e gás carbônico para fazer a fotossíntese, e conseqüentemente suas funções biológicas como reprodução e crescimento; Consomem CO₂; não apresentam nenhuma demanda adicional de água doce; as zonas áridas costeiras com águas subterrâneas salobras podem ser usadas para seu crescimento. A composição e a quantidade de lipídeos dependem da espécie de microalgas, e das condições de crescimento a que as mesmas são submetidas. (LONG et al., 2013).

A produção de biodiesel a partir de microalgas depende, principalmente, da disponibilidade de biomassa e aumento de escala de processo que necessitam de otimização (YANG et al. 2011). O sistema em que as microalgas são cultivadas também influenciam a produtividade de biomassa e o teor de lipídeos acumulado pelas células microbianas sendo assim, os reatores tubulares do tipo coluna de bolhas surgem como um dos modelos mais promissores para o cultivo de microalgas (MERCHUK, 2004), pois apresentam um alto potencial para cultivos em larga escala, facilidade de esterilização e redução de foto-inibição da fotoxidação (CHAGAS, 2010). Alguns autores relatam que um quilo grama de biodiesel poderia ser obtido a partir de aproximadamente 12 kg de biomassa de microrganismos fotossintéticos (VERMA et al.,2010; PETKOV et al.,2012).

Diante deste contexto, as microalgas apresentam um alto potencial energético, mas para que possam se tornar viáveis economicamente como fonte de energia e biocombustíveis há a necessidade de vencer uma série de desafios, dentre eles, a otimização na produção de biomassa microalga, bem como a sua porcentagem em lipídios também há a necessidade de aprimorar as tecnologias visando o processamento adequado da biomassa gerada, melhorar os processos de separação e cultivo, dentre outros para que as microalgas possam se tornar viáveis economicamente como fonte de energia e biocombustíveis. Ingressar nessa área é uma tarefa multidisciplinar e certamente há muito para ser desenvolvido e otimizado por profissionais da área de engenharia para alcançar a viabilidade do processo produtivo de microalgas em grande escala para serem utilizadas na produção de biocombustíveis (YANG et al., 2011). Para que estas melhorias possam acontecer nesse processo é importante ter como alternativa algumas ferramentas matemáticas, capaz de extrair um maior número de informações de um conjunto de dados.

A técnica de planejamento experimental vem sendo amplamente utilizada para melhorar o desempenho e reduzir a variabilidade de processos (FAROOQ et al., 2015), baseado nos fundamentos estatísticos é uma ferramenta que permite se chegar às condições otimizadas de bioprocessos ou avaliar os efeitos ou impactos que os fatores, ou variáveis, exercem nas respostas desejadas. A utilização desta ferramenta para a avaliação de sistemas biológicos é relativamente recente, principalmente na área de produção de biocombustíveis de microalgas (LI et al., 2011). Além da técnica de planejamento experimental, modelos cinéticos de crescimento celular, de consumo de substrato e de formação de produtos vem sendo empregados em bioprocessos afim de simular a dinâmica de crescimento da biomassa e produção de lipídios por microalgas pois, uma modelagem cinética adequada pode prever o desempenho e a otimização das condições operacionais no fotobiorreator bem como prever o seu comportamento mais facilmente do que as experiências de laboratório (BAILLEY E OLLIS 1986; JALALIZADEH, 2012; GALVÃO et al. 2013). Uma ampla pesquisa na literatura mostra que a maioria dos trabalhos de modelagem se concentra apenas no crescimento de microalgas em meio heterotrófico e muito poucos relatos estão disponíveis no que diz respeito em relação a modelagem cinética do crescimento das algas e produção de lipídios sob condições de depleção de nitrogênio (SURENDRHIRAN et al., 2014). Assim, compreende-se que o cultivo utilizando métodos estatísticos apresenta uma

importante proposta haja visto que, quando comparadas a outras matérias primas produtoras de óleo.

1.2 Problemas da Pesquisa

A queima de combustíveis fósseis tem contribuído consideravelmente para o aumento no aquecimento global devido à emissão de gases do efeito estufa e à medida que o mundo se confronta com uma crise energética devido à redução dos recursos finitos do petróleo e outros combustíveis fósseis, fica evidente a necessidade imediata de ações estratégicas para a redução destes gases nocivos, como a produção de combustíveis renováveis biodegradáveis, em que as consequentes emissões de CO₂ correspondem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa (GUPTA, TUOHY, 2013; NAJAFI, GHOBADIAN, YUSAF, 2011; MUBARAK ET AL., 2015; ZHU, 2015; MOAZAMI ET AL., 2011).

De acordo com a literatura (FRANCO et al., 2013) percebe-se que o cultivo de microalgas tem sua relevância na área de produção de biocombustíveis devido seu significativo potencial energético, associado ao fato de ser uma fonte de energia limpa e por contribuir significativamente para áreas de pesquisas biotecnológicas intermediadas pela Engenharia Química. Embora muito discutido como nova fonte de biocombustíveis, os relatos existentes no Brasil estão restritos a algumas instituições de pesquisa como universidades, ou algumas empresas do setor privado, as quais realizam seu estudo sem escala experimental, é visto que os estudos laboratoriais contribuem de forma significativa para uma tentativa de ampliação de escala dos projetos, de forma a minimizar os custos de produção desta fonte alternativa de energia. Dessa forma, aplicação de métodos matemáticos como as técnicas do DOE, oferecem oportunidades de aperfeiçoamento da qualidade e de aumento da produtividade, bem como o desenvolvimento e a utilização de modelos de regressão para predizer o comportamento de um processo sob diferentes condições a certo nível de confiança (ANTONY, 2006; RANA et al., 2015)

1.3 Justificativa e Importância

A justificativa deste trabalho se dá para preencher a lacuna existente na literatura no que se refere à integração de técnicas estatísticas em ambiente de Engenharia da

Sustentabilidade, com ênfase no processo de cultivo da microalga *chlorella minutíssima* para produção de biodiesel. A tabela 1-1 mostra uma análise realizada na base de dados Scopus, onde foi feito o cruzamento de palavras-chave na área da pesquisa desenvolvida. Observa-se que não foram encontradas publicações com a microalga *chlorella minutíssima* envolvendo os seguintes temas: Taguchi, Desirability, MSR e Modelo fenomenológico. Esse fato configura o ineditismo do estudo desenvolvido neste trabalho, pois o uso de tais ferramentas visa melhorar a qualidade do processo em questão.

Tabela 1-1 Representação das taxas de ocorrências das palavras-chave envolvidas na pesquisa realizada na base de dados Scopus.

Palavras- chave	Ocorrência	Base de dados
Microalgae and Biodiesel	1794	
Microalgae X DOE	277	
<i>Chlorella minutissima</i> X Biodiesel	23	
<i>Chlorella minutissima</i> X Optimization and Biodiesel	05	
<i>Chlorella minutissima</i> X DOE	02	
<i>Chlorella minutissima</i> X Method Taguchi	0	Scopus
<i>Chlorella minutissima</i> X Desirability	0	
<i>Chlorella minutissima</i> X MSR	0	
<i>Chlorella minutissima</i> X Mathematical model for the growth kinetics of microalgae	0	
<i>Chlorella minutissima</i> X Method Taguchi And Logistic Model	0	
<i>Chlorella minutissima</i> X Method Taguchi and X Mathematical model for the growth kinetics of microalgae	0	
<i>Chlorella minutissima</i> X Phenomenological model	0	

1.4 Objetivo

1.4.1 Objetivo Geral

Esta Tese teve por objetivo principal a determinação das melhores condições operacionais do sistema de cultivo em função dos níveis dos fatores envolvidos no processo que maximizem a produtividade celular e o teor de lipídeos, para que possam ser usados como fonte de matéria prima na produção de biodiesel. Com a finalidade de cumprir com esse objetivo geral, são propostos os seguintes objetivos específicos

1.4.2 Objetivos Específicos

- Construir fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas em nível laboratorial para realizar e estudar o crescimento da microalga marinha *C. minutíssima*;
- Desenvolver um estudo completo sobre o planejamento de experimentos (em inglês, *Design of Experiment*; DOE), análise exploratória e otimização;
- Estudar a aplicabilidade do DOE como instrumento da melhoria da eficiência no sistema de cultivo da microalga;
- Determinar as condições operacionais ótimas do processo por meio da Simulação do modelo cinético para configuração do fotobiorreator projetado no presente estudo;
- Caracterizar a matéria – prima lipídica quanto a sua aplicação na síntese de biodiesel;

1.5 Tema

O tema deste trabalho é uma abordagem sobre a melhoria no processo de cultivo da microalga marinha *C. minutissima*, com o objetivo de aumentar a produção a concentração celular e o teor lipídico, utilizando o Método de Taguchi como método experimental, *Desirability*, como ferramenta de procura de uma solução viável para melhoria conjunta das variáveis respostas. Também foram realizados estudos cinéticos usando modelo logístico afim de estimar parâmetros que descrevam as melhores condições de crescimento celular e acúmulo de lipídeos produzidos pela microalga, cultivadas em um fotobiorreator, projetado e construído para o desenvolvimento dessa pesquisa.

1.6 Método de Pesquisa

Para a elaboração de uma boa pesquisa científica, é de suma importância entender o propósito do estudo para que se faça a escolha adequada do método a ser utilizado. O método de escolha da pesquisa, organiza a maneira como o problema a ser estudado será abordado. Sendo assim, a relação entre o pesquisador e o objeto pesquisado encaminha um bom trabalho entre os objetivos da pesquisa e o pesquisador (BERTO e NAKANO, 2014).

Este trabalho, no que diz respeito a sua natureza trata-se de uma pesquisa aplicada, pois se caracteriza por seu interesse prático, onde os resultados são aplicados ou utilizados na solução de problemas que ocorrem na realidade. Adota uma abordagem quantitativa, requer o uso de métodos e técnicas estatísticas para estabelecer relações, entre as variáveis, dentre outros motivos (FONSECA,2002). Quanto aos objetivos, considera-se a pesquisa como sendo Axiomática Normativa, uma vez que objetiva -se a desenvolver normas, estratégias e ações; Novos modelos de otimização ou variações de modelos existentes são propostos para um problema idealizado. Quanto aos procedimentos apresenta como característica experimental a Modelagem e Simulação, que se caracteriza por definir, selecionar e determinar variáveis que possam ser capazes de influenciar qualquer fenômeno, podendo assim proporcionar ao pesquisador um controle sobre os efeitos que essas variáveis possam produzir (GERHARDT; SILVEIRA,2009). Na pesquisa experimental, De acordo com (MIGUEL,2012), esta tipologia consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis com potencial para influenciá-lo, e observar o comportamento de tal objeto. Para tal, o método de Pesquisa pode ser resumido e entendido seguindo o quadro 1-1.

Quadro 1- 1 Classificação da pesquisa

CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA			
Natureza	Problema	Objetivos	Procedimentos
Aplicada	Quantitativa	Axiomática Normativa	Experimental Modelagem e Simulação

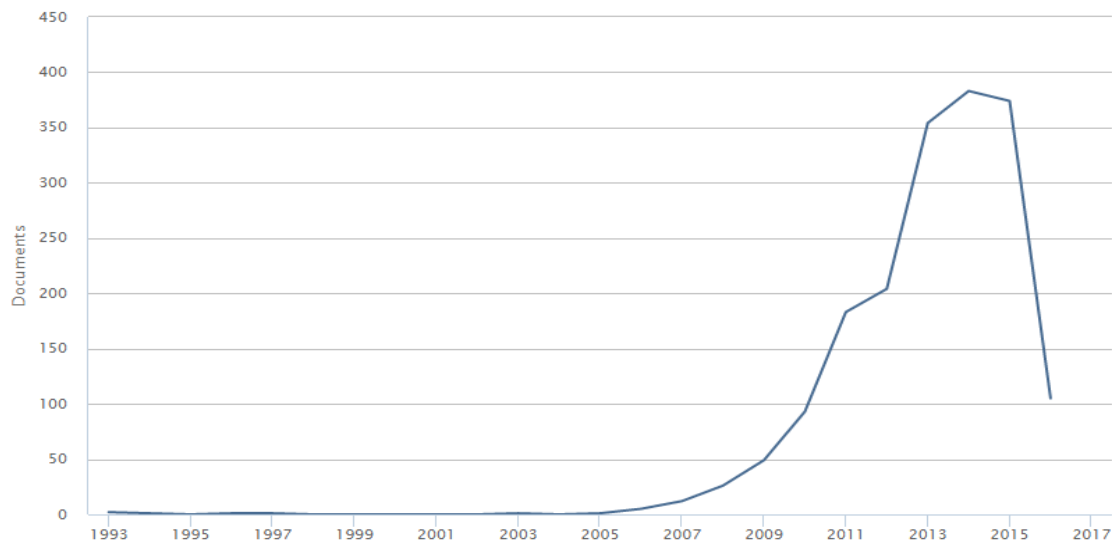
1.7 Delimitações do Trabalho

As Limitações desse trabalho servirão como sugestões e indicadores para pesquisas futuras na área. O presente estudo visa a melhoria de matéria prima microalgal para obtenção de biocombustível. Muitos são os obstáculos que precisam ser superados na produção de microalgas para fins energéticos. Os métodos e técnicas que foram utilizados são apenas alguns de vários disponíveis. Inúmeras são as espécies de microalgas existentes e utilizadas pela comunidade científica para estudos que visa à melhoria e aumento da eficiência no processo de transformação e biomassa microalgal em biocombustíveis bem como em aplicações energéticas e ambientais. Não se pretende inferir que esses métodos são mais eficazes que outros disponíveis na literatura. Os resultados aqui obtidos são válidos apenas para as condições experimentais percorridas no cultivo da microalga *C. minutíssima*, com a finalidade de otimização da produtividade celular e do acúmulo de material lipídico no processo em estudo.

1.8 Contribuições

O mundo tem sido confrontado com uma crise energética devido ao esgotamento dos recursos finitos de combustíveis fósseis, mudança climática devido ao acúmulo de gases causadores do efeito estufa e a degradação do solo e água, diante dessa situação cientistas e pesquisadores vem sendo forçados a encontrar fontes renováveis de energia alternativas. Os biocombustíveis de microalgas têm surgido como uma alternativa promissora, pois podem manter um ambiente mais saudável proporcionando um efeito positivo sobre a saúde humana, dos animais e sustentabilidade econômica para a sociedade atual. O uso de ferramentas matemáticas na área de bioprocessos é muito recente, principalmente na área de produção de biocombustíveis provenientes de microalgas. Elas surgem como alternativas para melhoria, otimização e até mesmo na ampliação de escala, pois são capazes de avaliar os principais efeitos ou impactos que as variáveis ou fatores, exercem sobre as variáveis respostas desejadas. Foi feita uma busca na base de dados Scopus com o cruzamento de palavras-chave utilizados na presente pesquisa a fim de avaliar o problema da pesquisa conforme pode ser observado na Figura 1-1

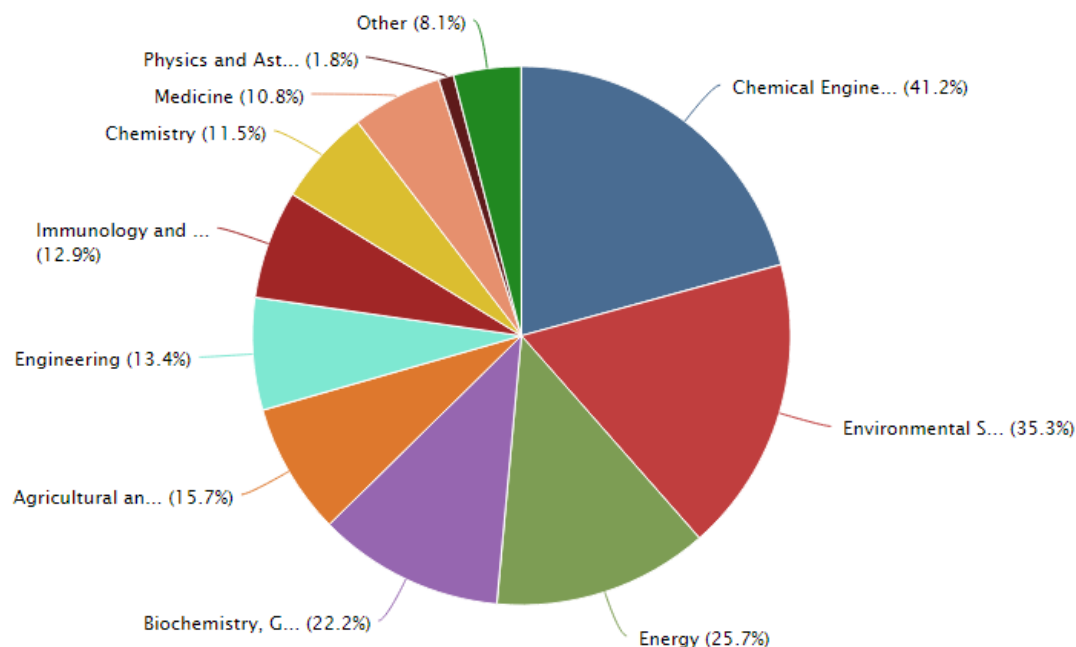
Figura 1-1 Publicações com relação a utilização de Microalga para produzir Biodiesel



Fonte: <http://www.Scopus.com>

Relacionando as palavras-chaves Microalgas x Biodiesel foi possível verificar a ocorrência de 1794 documentos do ano de 1993 a 2016, o que indica a exploração dessa matéria prima pela comunidade científica na obtenção do biodiesel. Dentre as áreas que concentram o maior número de publicações estão: Engenharia química com 41,2%, Ciências Ambientais 35,5%, Energia com 25,7% e Bioquímica, Biologia molecular e genética como 22,2%. Vale ressaltar que no Sistema Scopus (base de dados consultada), um trabalho pode ser classificado em mais de uma área o que gera um percentual total superior a 100%, como pode ser visto na Figura 1-2.

Figura 1-2 Gráfico de pizza para áreas das publicações de Microalgas x Biodiesel



Fonte: <http://www.Scopus.com>

Apesar da crescente utilização desse campo de pesquisa não foi possível encontrar na literatura um estudo que relacionasse a utilização da Microalga *Chlorella minutíssima* combinada com a ferramenta matemática planejamento de experimentos e modelagem fenomenológica que possam prever, bem como propor melhores condições viáveis para processos de cultivo dessa microalga. Desta forma, significativos avanços científicos na área de otimização de bioprocessos podem ser proporcionados no que diz respeito ao uso de métodos experimentais.

1.9 Estrutura do Trabalho

Este trabalho apresenta-se dividida em 5 capítulos, conforme descritos a seguir. O Capítulo 1 aborda a introdução, justificativa para a escolha do tema, o problema e o método de pesquisa, delimitações do trabalho e o caráter do ineditismo. No Capítulo 2 é dedicado a uma fundamentação teórica que embasa o estudo realizado apresentando uma descrição dos principais conceitos e publicações relacionados ao escopo dessa tese, abordando algumas aplicações comerciais e potencial energético das microalgas, características dos cultivos,

sistemas de cultivo e estudos envolvendo a espécie *Chlorella minutissima*, escolhida como microorganismo modelo, para esse trabalho alguns conceitos e aplicações dos métodos de projeto de experimento (DOE), tais como Método de Taguchi, função Desirability, Método de Superfície de Resposta e o modelo fenomenológico.

O capítulo 3 descreve as metodologias utilizadas no desenvolvimento da pesquisa, mostrando as etapas do processo químico e biotecnológico estudado de maneira detalhada, incluindo a concepção e construção dos fotobiorreatores, abordagem quanto aos métodos matemáticos bem como as etapas da simulação.

No Capítulo 4 apresenta e discute os principais resultados. Por fim, no Capítulo 5 encerra o presente estudo, apresentando de forma sucinta as principais conclusões obtidas acerca do estudo realizado, bem como sugestões e recomendações futuras para direcionar outros trabalhos para que possam dar continuidade na área.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cenário energético atual

Energia é a principal fonte para o desenvolvimento econômico de qualquer país. À medida que a economia e a tecnologia mundial avançam e o número da população aumenta, cresce também a demanda por combustível. Em 2005 houve um aumento no consumo de petróleo de 3,5%, que equivale a aproximadamente 2,8 milhões de barris por dia (Mb/d), em 2015, esse consumo alcançou os 103 Mb/d e até 2040 a demanda mundial de energia deverá aumentar em cerca de 35 % (CNI, 2007; TRIPATHI et al.,2016).

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém dos combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural). As fontes fósseis têm uma participação próxima de 86% do total da energia consumida mundialmente, cabendo ao petróleo um percentual de 37,2 %, ao carvão mineral 27,6 % e ao gás natural 21,2 %. Os 14 % restantes estão representados pela geração termonuclear 7,9 %, biomassa 3,2 %, hidroelétrica 2,3 % e demais fontes com apenas 0,6 %. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento em um futuro próximo, diante dessa expectativa da redução das reservas de petróleo, bem como a crescente preocupação com a preservação ambiental em virtude do aumento no nível de poluentes principalmente os causadores do efeito estufa, em sua maioria proveniente das

emissões de veículos que utilizam combustíveis fósseis (KOHLHEPP, 2010; BRENNAN ; OWENDE, 2010; ADENLE;HASLAM; LEE,2013).

A busca por combustíveis alternativos vem se intensificando cada vez mais nos últimos anos, sendo assim, diante da necessidade de expansão da matriz energética mundial, trazem-se como alternativa, os biocombustíveis, definidos como derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia (VASUDEVAN; BRIGGS,2008; SHEEHAN,2009; MUTANDA et al., 2011).

Desta forma considerando as estimativas negativas acerca do uso petróleo, o Brasil vem desenvolvendo tecnologias voltadas para produção e uso de fontes renováveis de energia (Azeredo 2012). O Brasil está em destaque, no que diz respeito a energias renováveis compondo 45 % de sua matriz, enquanto que no mundo este valor não ultrapassa 14 %. Nos Estados Unidos, por exemplo, este percentual é de apenas 4,3 % e na Inglaterra de 1,1 % (BRASIL, 2006; CORDEIRO, 2008).

O histórico da produção brasileira de biodiesel mostra que o setor está em crescente dependência de uma única matéria-prima, a soja, que se destaca como a principal fonte de matéria-prima lipídica utilizada na produção de biodiesel no Brasil, correspondendo a aproximadamente 80% do biodiesel produzido e comercializado (BRESSAN ,2008; ANP, 2015). Entretanto, alguns problemas vêm sendo relatados quanto à utilização de fontes oleaginosas para a síntese de biodiesel. Um dos gargalos identificados é o uso do solo, pois é preciso avaliar as extensões de terras agricultáveis disponíveis pois pode haver conflito com a produção de alimentos, uma vez que muitos países enfrentam sérios problemas de fome e escassez, bem como a insuficiência de água e adubo (CARVALHO JÚNIOR, 2010; BRANDINI, 2011).

Diante desse contexto pode-se observar, que o setor energético exige uma grande demanda por recursos naturais, sendo de suma importância o uso de fontes renováveis para geração de energia. Assim, a busca pela matéria-prima ideal tem se tornado constante e evoluído muito nos últimos anos. O cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis tem se tornado uma alternativa bastante promissora. O uso das microalgas como fonte viável de biomassa tem causado grande expectativa neste setor, apresentando vantagens como a não competição com alimentos, rápidas taxas de crescimento, acúmulo de

lipídeos, alta tolerância às condições extremas do meio ambiente, capacidade de serem cultivadas de maneira intensiva e grande potencial no uso em biorremediação e biofertilização. Além disso, tem a capacidade de produzir uma alta gama de bicompostíveis tais como: biodiesel, biohidrogênio, biogás e bioetanol, bem como a produção de vários bioprodutos onde, objetivam a estruturação de plantas comerciais no conceito de biorrefinarias (CHISTI, 2007; RODOLFI ET AL., 2009; CGEE, 2010; LAURENS,2010; FITZPATRICK ET AL., 2010; BALASUBRAMANIAN ET AL., 2012; DOGARIS ET AL., 2013; KOLLER ET AL., 2014; BEETUL ET AL., 2014; GIRARD ET AL., 2014; ZHU, 2015).

2.2 Biocompostíveis como uma alternativa aos combustíveis fósseis

A produção de biocompostíveis teve seu primeiro incentivo na década de 70, quando o petróleo estava dispendioso, e buscavam-se substitutos mais baratos ou mais confiáveis (BANSE et al., 2008). Hoje, além do quesito custo, há também a preocupação com o meio ambiente, o que incentiva ainda mais a substituição do petróleo pelos biocompostíveis (SILVA, 2014).

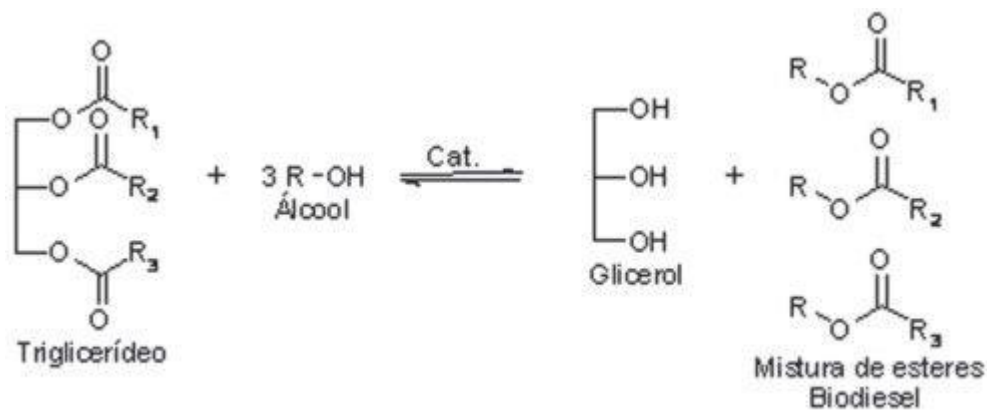
Os biocompostíveis derivados da biomassa assumem papel importante neste cenário. Dentre os principais biocompostíveis disponíveis estão o bioetanol e o biodiesel. O bioetanol é um combustível produzido a partir de processos fermentativos em biomassas que contenham açúcar e amido na sua composição, como cana-de-açúcar, milho ou grãos (HARUN e DANQUAH, 2011). O biodiesel é produzido a partir de diferentes fontes de oleaginosas, como por exemplo, a soja. Praticamente todas as suas propriedades são compatíveis com o diesel de petróleo, algumas vantagens são apresentadas quando comparado ao combustível fóssil tais como: biodegradabilidade; redução nas emissões dos gases de exaustão, possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros; apresenta excelente lubrificidade e poder calorífico, a sua utilização pode oferecer diversas vantagens, entre estas, sociais e econômica. Pode ser usado puro ou em misturas com o diesel em motores ciclo diesel, (PRAMANIK et al, 2005; KNOTHE et al.,2006; ARAUJO; DE LIMA, 2011; ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011).

O Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB), que foi criado pelo governo brasileiro em dezembro de 2004, estabeleceu a obrigatoriedade em utilizar uma

percentagem mínima de biodiesel misturado com diesel. Nos anos de 2008 a 2012 esta percentagem foi estabelecida em 2% e a partir de 2013 passou a ser de 5%, logo a utilização dessa mistura com o diesel resulta no caminho mais viável de aumentar o uso de biodiesel no setor do transporte brasileiro (ANP, 2016).

O biodiesel, é um combustível biodegradável, com baixa emissão de compostos poluentes na atmosfera, quando comparado ao diesel, podendo desta maneira, ser considerado o combustível do futuro. O biodiesel pode ser definido como sendo uma mistura de mono-alkilésteres de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais, gorduras animais e lipídeos de biomassa, obtidos pela reação de transesterificação que consiste numa reação entre um triglicerídeo, principal constituinte dos óleos e gorduras, e um álcool, na presença de um catalisador, originando glicerol e biodiesel (SCHUCHARDT; SERCHEL; VARGAS, 1998; PINTO et al., 2005 ; DA RÓS et al., 2013). A equação geral da reação de transesterificação está representada na Figura 2.1.

Figura 2-1 Representação esquemática da reação global de transesterificação



Fonte: (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006)

2.2.1 Matérias-primas lipídicas para produção de biodiesel

Biodiesel pode ser classificado em primeira, segunda e terceira geração dependendo da matéria-prima utilizada. Na primeira geração estão aqueles provenientes de culturas comestíveis, como por exemplo, biodiesel de soja. Culturas como a soja, palma, colza, trigo, milho, girassol e coco são consideradas como matérias-primas de primeira geração visto terem sido as primeiras culturas oleaginosas utilizadas para produção de biodiesel (AHMAD

et al.,2011). Essas matérias-primas não são consideradas sustentáveis, uma vez que entram em concorrência com culturas alimentícias comprometendo a oferta de alimentos (GUI; LEE; BHATIA, 2008; BRENNAN; OWENDE, 2010; RODRIGUES,2011). A produção de biodiesel a partir de óleos comestíveis também tem um impacto ambiental negativo, pois requer uma grande área de solo fértil para cultivo das plantações de oleaginosas, de modo a atender toda a demanda energética mundial, o que pode ocasionar sérios desequilíbrios ecológicos devido ao desmatamento das florestas (AHMAD et al., 2011).

O biodiesel de segunda geração é produzido a partir de diferentes fontes de biomassa vegetal, dando-se preferência para matérias-primas que não são utilizadas na alimentação humana (DAMASCENO, 2012). De acordo com definição, pode-se deduzir então que aqueles óleos vegetais que são altamente tóxicos e não podem ser consumidos na forma de alimentos, também poderiam produzir o biodiesel de segunda geração, como por exemplo o óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Os óleos vegetais são vantajosos, pois são biodegradáveis, mais fluidos se comparado com óleos de origem animal, possuem alto poder calorífico, e baixo teor de compostos sulfonados e aromáticos (KOH e GHAZI, 2011). Os óleos de origem animal possuem grandes quantidades de ácidos graxos saturados, tornando-os sólidos a temperatura ambiente o que acarreta problemas na produção do biodiesel (LEUNG, WU e LEUNG, 2010). Os de terceira geração, também são derivados de espécies não comestíveis. Nesse caso, tem-se as cianobactérias, algas e as microalgas. Nos últimos anos a microalga vem se mostrando, ser a matéria-prima mais adequada para a produção de biocombustíveis, podendo ser uma alternativa às culturas convencionais (NAJAFI, 2011; CHISTI,2007; HOSSAIN, 2012), a diferença com os demais biocombustíveis é que nesse existe a utilização da biotecnologia. São desta forma, conhecidos como biocombustíveis avançados e utilizam técnicas de biologia molecular (RODRIGUES, 2011).

Existem no mundo, aproximadamente 350 culturas oleaginosas com potencial para produção do biodiesel (ATABANI et al., 2012). A principal matéria-prima utilizada na produção de biodiesel no Brasil é a soja, cultivada numa área de 1 hectare é capaz de produzir 562 kg de biodiesel por ano, enquanto que o cultivo de uma espécie de microalga com elevado teor de óleo em 1 hectare, é capaz de fornecer 121104 kg de biodiesel, conforme pode ser observado na Tabela 2-1, que apresenta o potencial da produção de óleos por microalgas, bem como a capacidade produtiva de biodiesel em relação a área territorial

ocupada no cultivo comparado às culturas oleaginosas convencionais como milho, soja, camelina, girassol e palma.

Tabela 2- 1 Potencial de produção de óleo e biodiesel de diversas fontes Oleaginosas

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

Fonte: Mata; Martins; Caetano, 2010

De acordo com os dados da tabela 2-1 pode-se observar que provavelmente, as culturas de oleaginosas não podem colaborar significativamente para substituição dos combustíveis líquidos provenientes do petróleo em um futuro próximo. No entanto, este cenário pode ser modificado quando se considera a contribuição das microalgas para produzir matéria-prima a ser utilizada na produção de biodiesel. Entre 1 e 3% da área total de cultivo é suficiente para produzira biomassa de algas que satisfaz 50% das necessidades do combustível requerido para o transporte. (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010).

Desta forma os bicombustíveis de terceira geração, obtidos a partir de microalgas vêm ganhando cada vez mais espaço ao longo do tempo já que, representam uma fonte renovável

de biomassa, economicamente e ambientalmente sustentável, para a produção de biodiesel. O quadro 2-1 demonstra um resumo comparativo das matérias- prima utilizadas na obtenção de biocombustíveis de 1º, 2º e 3º gerações bem como os combustíveis derivados do petróleo com algumas benefícios e problemas.

.Quadro 2- 1 Comparação de biocombustíveis das três gerações com produtos derivados do petróleo

Fonte	Tecnologia	Matéria-Prima	Produto	Problema	Benefício
Fóssil	Refinaria de petróleo	Petróleo bruto	GLP, Gasolina, Nafta, Diesel, Querosene e combustível de aviação	Hidrocarbonetos presentes liberam gases que contribuem para o efeito estufa, Exaustão da reserva petrolífera, dificuldades econômicas e ecológicas.	Alto valor em termos de eficiência energética, Tecnologia desenvolvida, Facilidade no transporte, (líquido e gasoso).
Biomassa 1º Geração	Fermentação microbiana e transesterificação química e enzimática	Óleo vegetal, Milho, Girassol, Cana-de-açúcar	Biodiesel, Etanol de milho e de açúcar	Fontes limitadas (alimento X combustível) Mistura parcial com combustível	Ambientalmente correto, Econômico e Socialmente seguro.
Biomassa 2º Geração	Pré-tratamento, hidrólise e fermentação, Transesterificação	Origem lignocelulósica (resíduos florestais) Óleo residual Sebo bovino Gordura de frango	Bio-óleo, Óleo FT, Etanol, Butanol e Misturas de álcoois	A tecnologia não está totalmente pronta	Não compete por alimentos, Tecnologia em desenvolvimento, Ambientalmente e socialmente correta
Biomassa 3º Geração	Engenharia metabólica para a síntese direta fracionamento da biomassa algal	Algas Microalgas Cianobactérias	Biodiesel, Bioetanol, Biohidrogenio e Biometano	A tecnologia está em desenvolvimento, Elevados custos	Não compete por alimentos, ConsumodeCO2, Não há necessidade de utilizar água potável. Maior produtividade de óleo quando comparadas com as outras biomassas

Fonte: Adaptado de SUGANYA, 2016.

2.3 Biocombustíveis a partir de microalgas.

Durante as últimas décadas, os cientistas têm procurado por novas fontes alternativas de energia para substituir os combustíveis fósseis e eles descobriram que microrganismos fotossintéticos tais como microalgas têm o potencial para se tornar fontes alternativas. Microalgas têm a capacidade de converter energia solar em formas químicas através da Fotossíntese e têm maior taxa de crescimento do que as plantas superiores (NDIMBA et al., 2013; BRENNAN L, OWENDE, 2010).

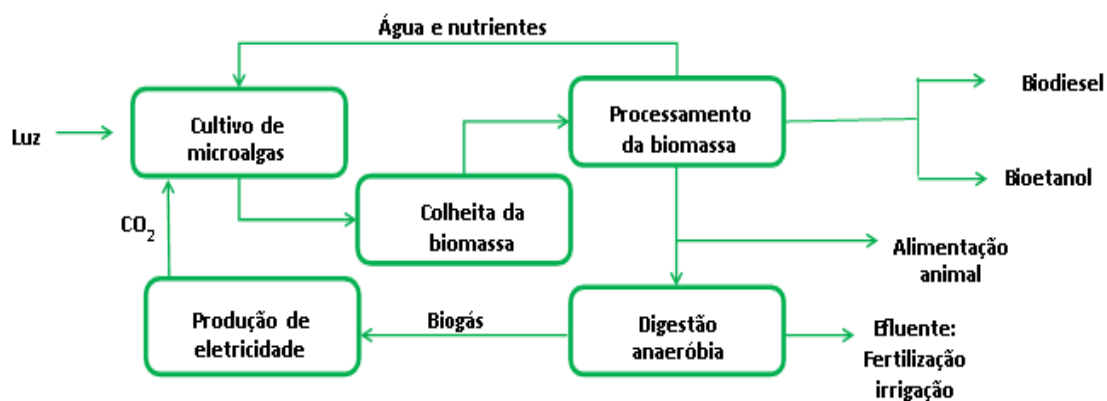
Por esta razão, o cultivo de microalgas vem sendo considerado uma alternativa para a independência energética que possuímos hoje com os combustíveis fósseis, podendo ser utilizados como matéria-prima para a produção de biocombustíveis e também desempenhar um papel importante para controlar a poluição ambiental uma vez que, são capazes de capturar eficientemente emissões de carbono de plantas industriais além de fornecer abundância de suplementos nutricionais. Isso se deve a inúmeras razões, entre elas o baixo consumo de água no seu cultivo, pois podem ser cultivadas utilizando água salgada, salobra ou mesmo águas residuais e um alto rendimento por área comparado a outras culturas e a possibilidade de se utilizar terras não agriculturáveis. Esse conjunto de características torna os biocombustíveis de microalgas uma alternativa energética com significativas vantagens sobre aqueles de 1ª geração (ex: etanol de caldo de cana e biodiesel de óleo de soja) e 2ª geração (ex: etanol de celulose), além disso são considerados por especialistas como a 3ª geração de biocombustíveis. (Brasil, 2013; YEN et al., 2013; SUGANYA et al., 2016).

2.3.1 Processo conceitual para a produção de biocombustível de uma biorefinaria a partir da biomassa microalgal

Estudos sobre a utilização do biodiesel e bio-produtos têm se mostrado promissores do ponto de vista da eficiência energética e ambiental. Entretanto, é preciso atingir um maior potencial comercial desses diversos produtos, para melhora a utilização de matérias-primas de biomassa maximizando seu valor. Nesse sentido será mostrado processo conceitual de produção de biodiesel e de uma biorefinaria a partir da biomassa microalgal.

Segundo Demirbas (2009) e Lourenço (2006), as emissões de gás carbônico emitidos pelas indústrias poderiam ser concentradas e canalizadas até uma estação de produção de biomassa algal, 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 2-2 (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

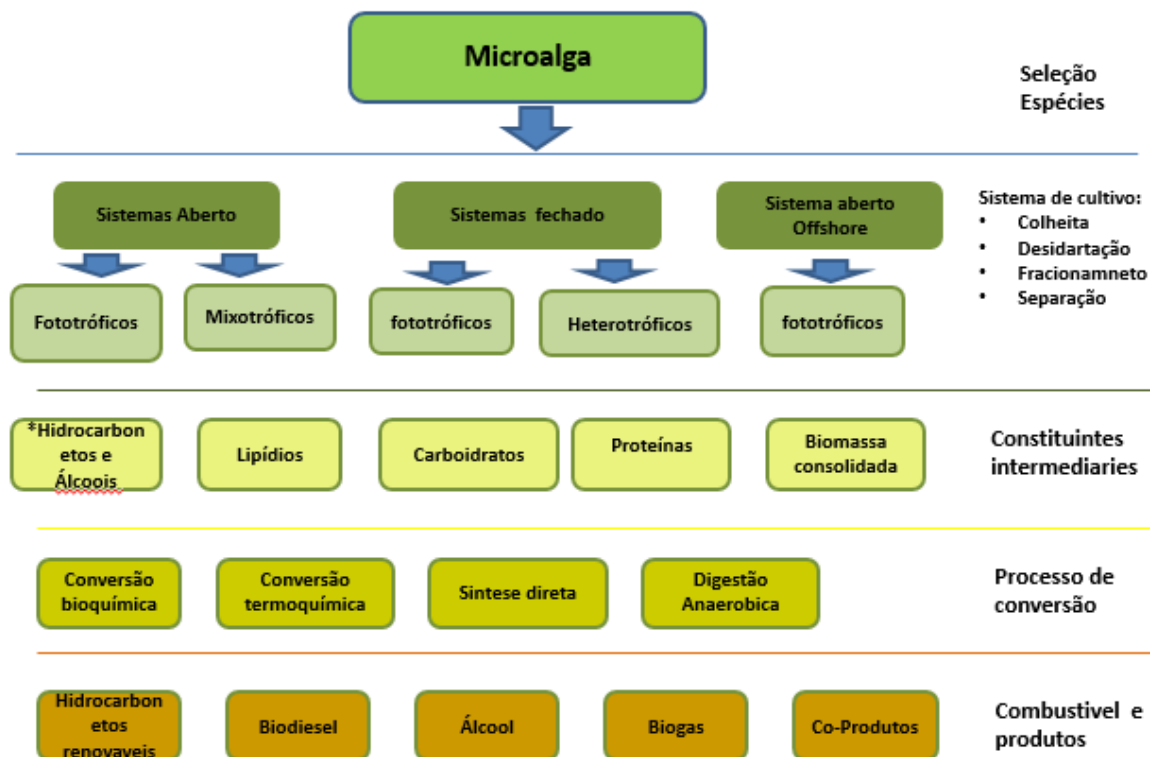
Figura 2-2 Processo conceitual da produção de biodiesel



Fonte: Adaptado de CHISTI, 2008.

O termo "biorrefinaria" baseia-se no conceito de refinarias de petróleo, que produzem vários combustíveis e produtos a partir do petróleo bruto. Biorrefinaria é uma instalação integrada, que combina vários processos e equipamentos para a produção de vários produtos comerciais, energia, biocombustíveis e produtos químicos de alto valor agregado a partir da biomassa visando um tratamento sustentável (NOBRE et al, 2013; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013). A figura 2-3 ilustra o processo conceitual de uma biorefinaria a partir da biomassa microalgal.

Figura 2-3 Microalgas: potenciais matérias-primas para aplicações comerciais



Fonte: Adaptado de Subhadra, 2010

2.4 Microalgas Uma abordagem Geral

As microalgas estão entre as formas mais antigas de vida do planeta, surgindo como precursoras das plantas, que são organismos microscópicos fotossintéticos podem ser encontradas em todo mundo, principalmente distribuídas nas águas em ambientes marinhos e de água doce, mas também podem ser encontradas na superfície de alguns tipos de solos que podem crescer rapidamente e viver em condições rigorosas devido à sua estrutura unicelular. O interesse por esses micro-organismos reside no seu potencial de utilização de sua biomassa para alimentação, rações, produtos químicos finos, tratamento de resíduos e aplicações energéticas (MATA, MARTINS & CAETANO, 2010; LOURENÇO, 2006; TOMASELLI, 2004).

As microalgas começaram a ser cultivadas para fins comerciais nos anos 60 no Japão com a cultura de *Chlorella* sp. Seguida, nos anos 70 pelo cultivo de *Spirulina* sp. no México,

Estados Unidos e China (RICHMOND, 1990). As indústrias de biotecnologia de microalgas cresceram e se desenvolveram nos últimos 30 anos. Os estudos com microalgas têm tomado espaço importante dentro da biotecnologia, sendo que países como Estados Unidos, Japão, Itália, Israel, França, Canadá, México, Austrália e Índia têm aprimorado os estudos nesta área. (SPOLAORE et al., 2006).

Já no Brasil os primeiros estudos realizados envolvendo cultivo de microalgas foi no início da década de 70, com a criação de um laboratório com algumas dezenas de cepas na Universidade de São Paulo. A partir de 1980, esses cultivos começaram a se difundir no Brasil, com envolvimento de pesquisadores e universidades de vários Estados (LOURENÇO, 2006; EMBRAPA, 2014). Pesquisas com microalgas, no Brasil, são relativamente recentes e têm focado, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições, como meios de cultivo, e outros parâmetros como nutrientes, temperatura, salinidade e luz (COSTA et al., 2002; SIPAÚBA et al., 1999).

Segundo ZASLAVSKAIA et al. (2001), microrganismos fotossintéticos como microalgas presentes nos ambientes aquático são responsáveis pela produção de O₂ e fixação de CO₂. A biomassa produzida da assimilação de CO₂ pode ser transformada em alimento humano, ração animal e os ácidos graxos extraídos da biomassa podem ser convertidos a biocombustíveis ou até alimentos e fármacos (SCRAGG et al, 2003).

O valor nutricional das microalgas depende, principalmente, da sua composição bioquímica. Embora exista uma grande diferença nas composições das microalgas em função da classe e a espécie que se está trabalhando (COUTTEAU, 1996). A manipulação das condições ambientais e os diferentes estágios de crescimento podem alterar a composição bioquímica das microalgas (BROWN et al., 1999).

2.4.1 Classificação dos microrganismos fotossintéticos

São organismos microscópicos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido a sua estrutura celular simples, unicelular ou multicelular (MATA et al., 2010; SCOTT et al., 2010). A biodiversidade de microalgas é enorme e eles representam um recurso quase inexplorado. Estima-se que existam entre 200.000 a 800.000 espécies de microalgas, dentre as quais, apenas 50.000 tenham sido descritas (CHISTI, 2004). Os quadros 2-2 e 2-3 e a figura 2-4 demonstram os quatro grupos mais importantes em termos de abundância: as algas verdes (*Chlorophyceae*), as verde-azul

(*Cyanophyceae*), as marrons douradas (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*) AL HATTAB;GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015) .Os microrganismos fotossintéticos podem ser divididas em procarióticas (cianobactérias) e eucarióticas, estas por sua vez, com 12 divisões conforme descrito no quadro 2-2 (REIBER, 2007). A microalga utilizada no presente trabalho pertence ao reino dos Eucariotos e divisão *Chlorophyta* (quadro2-2). Quanto a sua cor é classificada como verdes e pertence ao grupo *Chlorophyceae* que podem ser observado no quadro 2-3 e figura 2-4.

Quadro 2- 2 Classificação dos grupos de microrganismos fotossintéticos

Reino	Divisão	
Procariotos	<i>Cyanophyta</i>	Cianobactérias
	<i>Prochlorophyta</i>	
Eucariotos	<i>Glucophyta</i>	Microalgas
	<i>Rhodophyta</i>	
	<i>Heterokontophyta</i>	
	<i>Haptophyta</i>	
	<i>Cryptophyta</i>	
	<i>Dinophyta</i>	
	<i>Euglenophyta</i>	
	<i>Chlorarachniophyta</i>	
	<i>Chlorophyta</i>	
	<i>Bacillariophyta</i>	
	<i>Xanthophyta</i>	
	<i>Phaeophyta</i>	

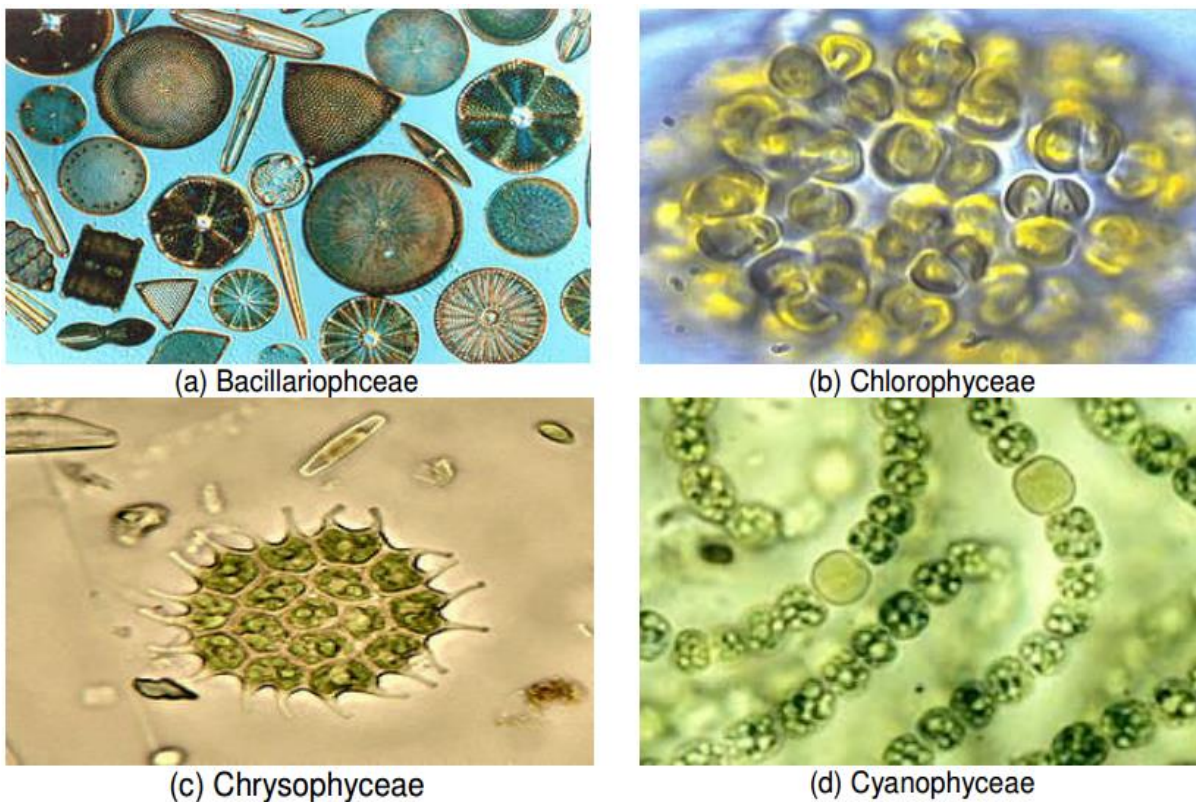
Fonte: ADL et al., 2005; REIBER, 2007

Quadro 2- 3 Classificação microalgas conforme cor e Grupo

Tipo	Cor	Grupo
Microalga	Diatomáceas	<i>Bacillariophyceae</i>
	Verdes	<i>Chlorophyceae</i>
	Verde-azul	<i>Cyanophyceae</i>
	Marrons	<i>Chrysophyceae</i>

Fonte:(DEMIRBAS, 2010; ALAM et al., 2012; AL HATTAB;GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015)

Figura 2-4 Grupos mais abundantes de microalgas



Fonte: AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015

2.4.2 Composição das microalgas

A composição das microalgas são fundamentalmente carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, sendo que as proporções variam amplamente entre as espécies e de acordo com as condições de cultivo. As proporções de lipídeos presente nesses microrganismos varia normalmente de 5% a 75% em porcentagem de biomassa seca, dependendo da microalga em questão, sendo que, as espécies estudadas em sua maioria apresentam em torno de 20% a 50% de lipídeos. Os triglicerídeos das microalgas conhecidas apresentam composição em ácidos graxos (14 a 22átomos de carbono) semelhante à dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (METTING,1996; SPOLAORE*etal.*,2006; MATA*etal.*,2010; AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

As microalgas têm se destacado por conter em sua composição inúmeras vitaminas essenciais: vitamina A, B1, B12, E, dentre outras. O teor de vitaminas em microalgas

varia entre espécies e de acordo com as técnicas de cultivo. As vitaminas possuem importantes propriedades antioxidantes, funções imunológicas, reprodutivas e preventivas (doença renal, depressão e asma) (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

Todas as microalgas possuem um ou mais tipos de clorofila dentre os quatro tipos existentes, clorofila a,b, c e d, sendo a clorofila a o pigmento mais importante para a fotossíntese, representando papel principal no arranjo dos fotossistemas para a captação da energia luminosa. Comercialmente, as clorofilas são utilizadas principalmente na indústria de corantes naturais (LOURENÇO, 2006).

Os carotenoides compreendem o segundo grupo de pigmentos fotossintetizantes, podendo atingir 25% da biomassa seca microalgal dependendo da espécie e condição de cultivo. Os carotenoides são divididos em carotenos, moléculas que contém apenas carbono e hidrogênio, como o β -caroteno, e as xantofilas, que além de carbono e hidrogênio, apresentam oxigênio em sua estrutura, como a luteína. A grande aplicação comercial dos carotenóides deve-se principalmente a sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante, sendo utilizados para a indústria médica, farmacêutica, nutricional e de cosméticos (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015). A figura 2-5 apresenta de forma resumida a composição da Microalgas e a tabela 2-2 apresenta a composição química de algumas microalgas em (% de peso seco).

Figura 2-5 Composição Microalgas

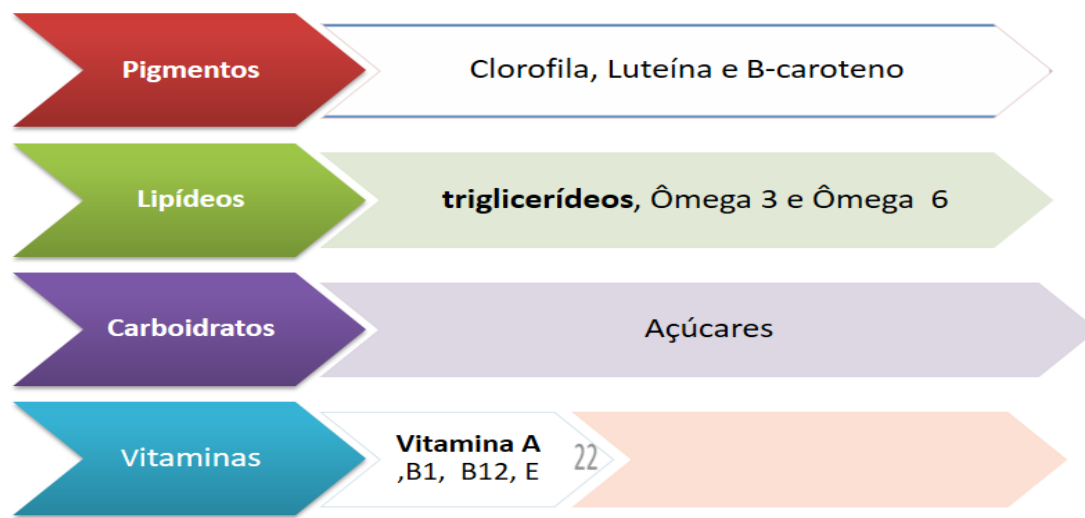


Tabela 2- 2 Composição química de algumas microalgas

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

Fonte: SUGANYA; VARMAM; MASJUKI; RENGANATHAN, 2016

As microalgas sintetizam os lipídeos a partir da fonte de carbono, seja inorgânico (CO₂) ou orgânico (glicose, acetato, etc.). Os componentes e os teores de lipídeos nas células das microalgas variam de espécie para espécie. Os lipídeos neutros, como os triglicerídeos, são considerados como o principal material para a produção do biodiesel (G. 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 *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%, de acordo com a manipulação dos cultivos visando ao acúmulo de lipídeos,

conforme apresentado na tabela 2-3, porém com baixa produtividade de biomassa. Entretanto, espécies como *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 2- 3 Espécies produtoras de lipídeos e suas respectivas porcentagens em relação a massa seca.

Espécies	Conteúdo de óleo (% em massa seca)
<i>Botryococcusbraunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella minutissima</i>	15,5
<i>Chlorella sp.</i>	28 – 32
<i>Crypthecodinuimcohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 – 37
<i>Dunaliellaprimolecta</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>Neochlorisoleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia sp.</i>	45 – 47
<i>Phaeodactylumtricornutum</i>	20 – 30
<i>T. pseudonana</i>	39,5
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77
<i>Tetraselmissueica</i>	15 – 23
<i>T. fluviatilis</i>	40,3

Fonte: Adaptado de CHISTI, 2007

2.4.3 Reprodução

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

Segundo Lourenço (2006), o processo de reprodução sexuada pode ser classificado em três tipos: Isogamia, presença de dois gametas móveis idênticos, ou quase idênticos; Anisogamia, presença de dois gametas diferentes em tamanho; Oogamia, presença de um gameta pequeno, móvel ou não, e um gameta bem maior e imóvel.

2.5 *Chlorella minutíssima*

O nome da microalga *Chlorella* provém do grego *chloro* (verde), e do sufixo diminutivo latino *ella* (pequeno), de acordo com a taxonomia a *Chlorella minutíssima* é classificada da seguinte forma: pertencente à Divisão - *Chlorophyta*; Classe - *Chlorophyceae*; Ordem - *Chlorococcale*; Família - *Oocystaceae*; Gênero – *Chlorella* e Espécie – *minutíssima*. A imagem da microalga *Chlorella minutíssima* pode ser observada na figura 2-6.

Figura 2-6 Microalga *Chlorella minutíssima*



Fonte: Mata et al., 2006

A espécie *Chlorella minutíssima* é uma microalga unicelular microscópica, eucariótica, esférica e com diâmetro variando entre 5-10 μm , possui uma rígida parede

celular, pode ser encontrada em tanques e lagos, com alta capacidade fotossintética. Contém pigmentos verdes como a clorofila-a e -b em seu cloroplasto (aproximadamente 2% do seu peso seco), os lipídios são um dos principais componentes. Multiplica-se rapidamente e utiliza dióxido de carbono, água, luz solar e pequenas quantidades de minerais para reproduzir-se, desta forma, serve como uma fonte potencial de alimento e de energia devido a sua eficiência fotossintética. (ZELITCH, 1971; BECKER, 1994, COSTA et al., 2006; MORAIS, 2006).

2.6 Classificação quanto ao Metabolismo.

O crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo, dependendo de sua espécie, apresentam três tipos principais de metabolismo: autotrófico, com utilização da luz como fonte única de energia que é convertida em energia química por meio de reações fotossintéticas; heterotrófico: utilização apenas de compostos orgânicos dissolvidos como fonte de carbono e energia; e mixotrófico: conseguem simultaneamente realizar a fotossíntese e consumir carbono inorgânico e orgânico, o que permite aumentar a sua produtividade. (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA, MARTINS & CAETANO, 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2010; CHEN et al., 2011, BHATNAGAR, CHINNASAMY, SINGH, 2011). O quadro 2- 4 apresenta de forma resumida as características das condições de cultivo

Quadro 2- 4 Características das condições de cultivo

Condição de Cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fototrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Compostos Orgânicos	Orgânico
Mixotrófico	Luz ou composto Orgânico	Inorgânico ou Orgânico
Foto- Heterotrófico	Luz	Orgânico

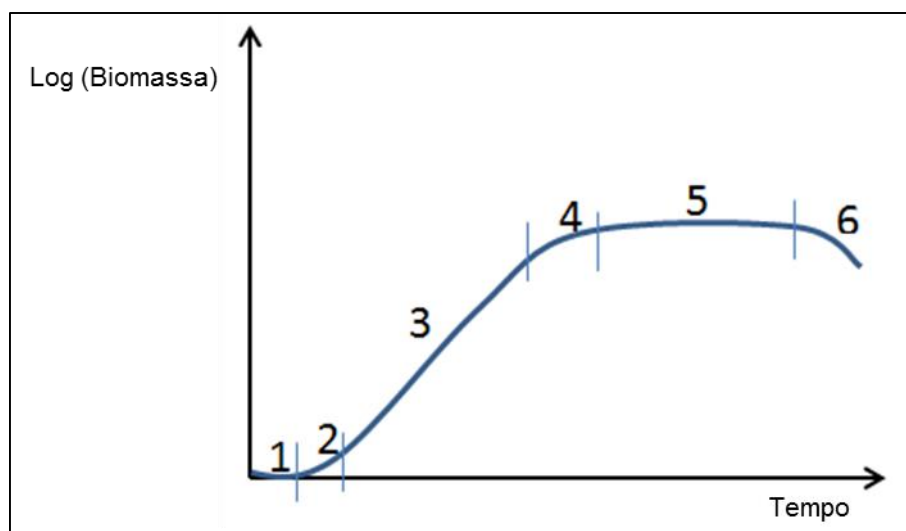
Fonte: CHEN et al., 2011

2.7 Sistema de cultivo

Quanto ao regime de cultivo, destacam-se os cultivos em batelada ou descontínuo, semicontínuos e contínuos. Nos cultivos em batelada ou descontínuo, as células são

inoculadas no meio reacional no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes. Este sistema é caracterizado por modificações intensas na composição do meio de cultura ao longo do processo. No regime de batelada, há etapas de crescimento bem definidas que podem ser acompanhadas ao longo do tempo e obter uma curva (Figura 2-7) que mostra as várias fases características do crescimento de populações microbianas (YUAN-KUN & HUI, 2004; RICHMOND 2004; LOURENÇO, 2006). É possível observar seis fases durante o crescimento celular das microalgas em cultivos descontínuos: fase de adaptação; fase de aceleração do crescimento; fase de crescimento exponencial; fase de desaceleração do crescimento; fase estacionária e fase de morte. Fase de adaptação ou *lag* (1), que ocorre devido à presença de células inviáveis ou esporos no inoculo ou devido ao período de adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo, mas pode ser evitada quando células em crescimento exponencial avançado são usadas como inoculo; fase exponencial ou logarítmica (2), onde inicia o crescimento e a multiplicação e as células se dividem como uma função exponencial do tempo, enquanto substratos, luz e temperatura adequada estiverem disponíveis; fase de redução do crescimento ou de transição (3); fase estacionária (4); fase de declínio ou de morte (5). Esse tipo de cultivo é interessante para pesquisa, onde se deseja entender o comportamento do sistema frente às condições operacionais aplicadas.

Figura 2-7 Variação da biomassa numa cultura em modo batelada



Fonte: Adaptado de LOURENÇO, 2006

Segundo Lourenço (2006), o início dos cultivos em modo semicontínuo, é similar ao sistema descontínuo, na qual inocula-se as microalgas num meio de cultura fresco, e aguarda-se atingir a fase estacionária, a partir da qual, 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. Já nos cultivos contínuos ocorre um permanente processo de entrada de meio de cultura fresco (sem células) e saída de cultura em iguais taxas e de modo constante. A operação de cultivos em modo contínuo pode exigir alguns dias ou semanas de espera, até atingir a estabilização da cultura e produção de grandes quantidades de células homogêneas que são extremamente interessantes em nível comercial (LOURENÇO, 2006).

2.8 Cultivo de microalgas.

O cultivo de microalgas pode ser executado em diversos sistemas com volumes e características diferentes, dentre os quais se destacam sistema aberto *raceway*, em águas naturais (lagos, lagoas), em lagoas artificiais, tanques, ou sistemas fechados como fotobiorreatores, que possuem paredes transparentes para exposição à luz solar ou radiação artificial para facilitar a fotossíntese (RAZZAK, 2013).

Uma das vantagens do cultivo em sistema aberto é a facilidade de sua construção e operação se comparado aos sistemas fechados. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados antes da escolha do sistema como: a biologia da alga, área de implantação do sistema, energia, água, nutrientes, clima e tipo de produto final desejado (ZIOLKOWSKA; SIMON, 2014; PRUVOST, 2015).

A produção comercial de biomassa microbiana é limitada a poucas espécies de microalgas que podem ser cultivadas em sistemas abertos, por meio de um ambiente seletivo ou altas taxas de crescimento. A maioria das algas não pode ser mantida por muito tempo em sistemas abertos devido a riscos de contaminação por fungos, bactérias, protozoários e competição por outras microalgas que tendem a dominar a espécie original usada como inóculo (RICHMOND, 2004; DEMIRBAS, 2010; ZHU; RONG; ZONG, 2013). Entre as limitações do cultivo de microalgas em sistema aberto destacam-se a utilização de pouca luz

pelas células, perdas por evaporação, a difusão do CO₂ para a atmosfera e a exigência de grandes áreas de terra. Além disso, suas taxas de transferência de massa são muito pobres, devido aos mecanismos de agitação em sistemas de cultivo aberto serem menos eficientes, resultando em uma baixa produtividade de biomassa (UGWU, AOYAGI e UCHIYAMA, 2008; AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015). A figura 2-8 representa dois tipos de tanques abertos, “*Circular pond*” e “*raceway pond*” respectivamente.

Figura 2-8 Tanques abertos “*Circular pond*” (a) e “*raceway pond*” (b)



Fonte: JASSINNEE et al., 2016

2.8.1 Fotobiorreator

O fotobiorreator pode ser definido como um recipiente fechado (ou parcialmente fechado) que visa de maneira fototrópica, fornece energia a partir de iluminação solar ou artificial (ANDERSEN, 2005). Os fotobiorreatores tubulares são considerados os únicos tipos de sistemas fechados plausíveis para produção de culturas em alta escala (CHISTI, 2007; MENETREZ, 2012). Se comparados com os sistemas de cultivo aberto, os fotobiorreatores apresentam características mais vantajosas sendo que auxiliam no controle de pH e temperatura, fornece melhor proteção da cultura contra contaminações, a agitação é mais eficiente, há menor perda por evaporação e a densidade celular atingida é maior (COSTA, 2010; MATA, MARTINS; CAETANO, 2010; BRENNAN; OWENDE, 2010; CHRISTENSON; SIMS, 2011).

Vários modelos de fotobiorreatores podem ser encontrados, contudo, devem-se priorizar os protótipos que forneçam as condições ideais para o tipo de cultura que está sendo analisada. Em geral, os fotobiorreatores constituídos por uma estrutura mais sofisticada são mais versáteis, porém, apresentam maior custo de produção (ANDERSEN, 2005). Os

fotobiorreatores possuem propriedades biológicas altamente eficientes uma vez que tornam possível a conversão do dióxido de carbono em biomassa apresentando um alto rendimento dessa biomassa microalgal, além de proporciona um controle mais eficiente da cultura (CHIU et al., 2008; WALKER, PURTON e BECKER, 2005). Segundo UGWU, et al (2007), inúmeros fotobiorreatores podem ser utilizados para a produção de microalgas, porém, devem-se desenvolver protótipos que sejam adequados para o crescimento microalgal no intuito de obter uma quantidade relativamente satisfatória de biomassa. Para isso, é de fundamental importância a homogeneidade na distribuição da luz (em intensidade adequada para não provocar foto inibição); o regime hidrodinâmico que evite a deposição de material biológico em “zonas mortas”, mas que ao mesmo tempo não provoque estresse da cultura por excesso de agitação; troca de gases eficientes para liberar o oxigênio formado na fotossíntese especialmente, evitando a auto-intoxicação da cultura e possível formação de peróxido de hidrogênio caso a quantidade de luz seja excessiva (RICHMOND, 2004). O quadro 2-5 apresenta vantagens e limitações de sistemas aberto e fechado (CHISTI, 2007; BRENNAN; OWENDE, 2010; DEMIRBAS, 2010; RAZZAK, 2013; BOROWITZKA, 1999; KHOO, 2011; ZHU; RONG; ZONG, 2013; Gouveia, 2011; Amin, 2009)

Quadro 2- 5 Vantagens e limitações de sistemas aberto e fechado

Sistema de produção	Vantagens	Limitação
Lagoas Abertas	Baixo custo de capital	Baixa produtividade de biomassa
	Baixo custo de operação	são necessários Grandes áreas de terra.
	Facil de limpar	Limitado a algumas cepas de microalgas
	Não utiliza terras agricultáveis	Pobre luz e eficiência de utilização de CO ₂
	Baixa entrada de Energia	As culturas são facilmente contaminados
	Fácil Manutenção	A evaporação e a água perdas são significativas
	Sistema simples	Nenhum sistema de refrigeração
	Fácil de ampliar-se a nível comercial	Dificuldades no controle do crescimento
		Os custo de colheita são relativamente mais elevados

		Baixa eficiência de mistura
		Mais do que uma espécie pode ser cultivada
Fotobiorreator Tubular	Adequado para culturas ao ar livre	Alto custo de investimento
	Grande área de superfície de iluminação	Requer grande espaço de terra
	Grande quantidade biomassa de microalga	Gradientes de pH, O ₂ e CO ₂ dissolvido ao longo dos tubos
	Cultura com espécies simples	Usa bombas para aeração do sistema
	Menos de 0,1 m de diâmetro para facilitar a penetração da luz	Inibição da fotossíntese pela alta concentração de O ₂
	Fácil de projetar, instalar e operar	Limite de comprimento máximo no tubo e corrida contínua
	Os custos de recuperação mais baixos devido a alta produção de biomassa	Crescimento na parede do tubo, encrustação
	Boa concentração biomassa	

Quadro 2- 5 Vantagens e limitações de sistemas aberto e fechado (continuação)

Sistema de produção	Vantagens	Limitação
Fotobiorreator de Placas	Curto tempo de colheita	
	Maior relação superfície e volume	
	Relativamente barato	Difícil para produção em larga escala

	Alta produtividade de biomassa	dificuldades em controlar a temperatura
	Fácil de limpar e esterilizar	Limitação de crescimento na região perto da parede
	Baixo cúmulo de e oxigênio	Dificulddae de controlar a difusão de co2
	Boa iluminação na superfície	Pode ocorrer Photo-inibição
	Boa Incidencia de luz	Pode ocorrer estresse hidrodinâmico
	Baixa contaminação	
	Bom para imobilização das microalgas	
	Bom para culturas exteriores e interiores	
Fotobiorreator de Coluna	Compacto	Relativamente caro
	Alta transferência de massa	Alto custo de manutenção
	Baixo consumo de energia	Pequena área de iluminação
	Possui um bom sistema de mistura e de fácil de esterilização	Tensão de corte mais alto
	Bom para a imobilização de microalgas	Material Sofisticado para construção
	Menos problema de fotoinibição e foto-oxidação	Difícil produção em larga escala
		Padrão de fluxo Complex
		Baixa proporção entre superfície e volume

Fonte: Adaptado JASSINNE et al, 2016

Os cultivos microalgais são conduzidos sob os mais diversos regimes de cultivos, bem como a diversidade de suas espécies. O quadro 2-6 representa um resumo de algumas espécies de microalgas cultivadas em diferentes configurações de fotobiorreatores

Quadro 2- 6 Utilização de diversos fotobiorreatores no cultivo de microalgas

Configuração	Resumo	Referência
Coluna de bolhas	O cultivo da microalga <i>Karlodinium veneficum</i> foi conduzido para avaliar parâmetros como taxa de fluxo gasoso, altura da coluna e diâmetro do dispersor de ar.	López-Rosales et al., (2015)
Coluna de bolhas	A microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> foi cultivada com a finalidade obter informações sobre o perfil de consumo de CO ₂	Valdés et al., (2012)
Tubular	A microalga <i>Chlorella vulgaris</i> foi cultivada em dois estágios como estratégia para acumular lipídeos para a produção de biodiesel	Chen et al., (2014)
Placas planas	Avaliou-se o cultivo da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sob diferentes gradientes de iluminação ao longo do fotobiorreator.	J. Huang et al., (2014)
Tanque aberto (raceway)	Projetou-se um sistema de quebra bolhas para aumentar a eficiência de absorção de CO ₂ no cultivo de uma espécie mutante do gênero <i>Chlorella</i> .	Cheng et al., (2016)
Tanque aberto (raceway)	O cultivo da microalga <i>Nannochloropsis</i> sob condição de estresse nutricional em tanque aberto com a finalidade de acumular lipídeos para a produção de biodiesel.	Perrier et al., (2015)

2.9 Colheita da biomassa

Após o período de cultivo deve-se proceder a colheita da biomassa microalgal, removendo a água para posterior processamento de biocombustíveis. No entanto, o processo de colheita é geralmente caro e representaram cerca de 20-30% do custo de produção total dos biocombustíveis (ZHANG et al., 2010, DEMIRBAS, 2010). Portanto, é importante escolher métodos de colheita adequados para minimizar o custo global. Os métodos de colheita são altamente dependentes do tipo de microalgas, dependem da densidade celular da área cultivada (PRAGYA N, PANDEY KK, SAHOO, 2013). Os principais métodos de colheita de microalgas são: coagulação, floculação, eletrofloculação, biofloculação, sedimentação gravimétrica, flotação, filtração e centrifugação (BARROS et al., 2015), que serão representados no quadro 2-7 com suas respectivas vantagens e desvantagem para cada método de colheita das microalgas.

Quadro 2- 7 Vantagens e desvantagem dos métodos de colheita de microalgas

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

Fonte: BARROS et al., 2015

2.10 Extração de lipídeos

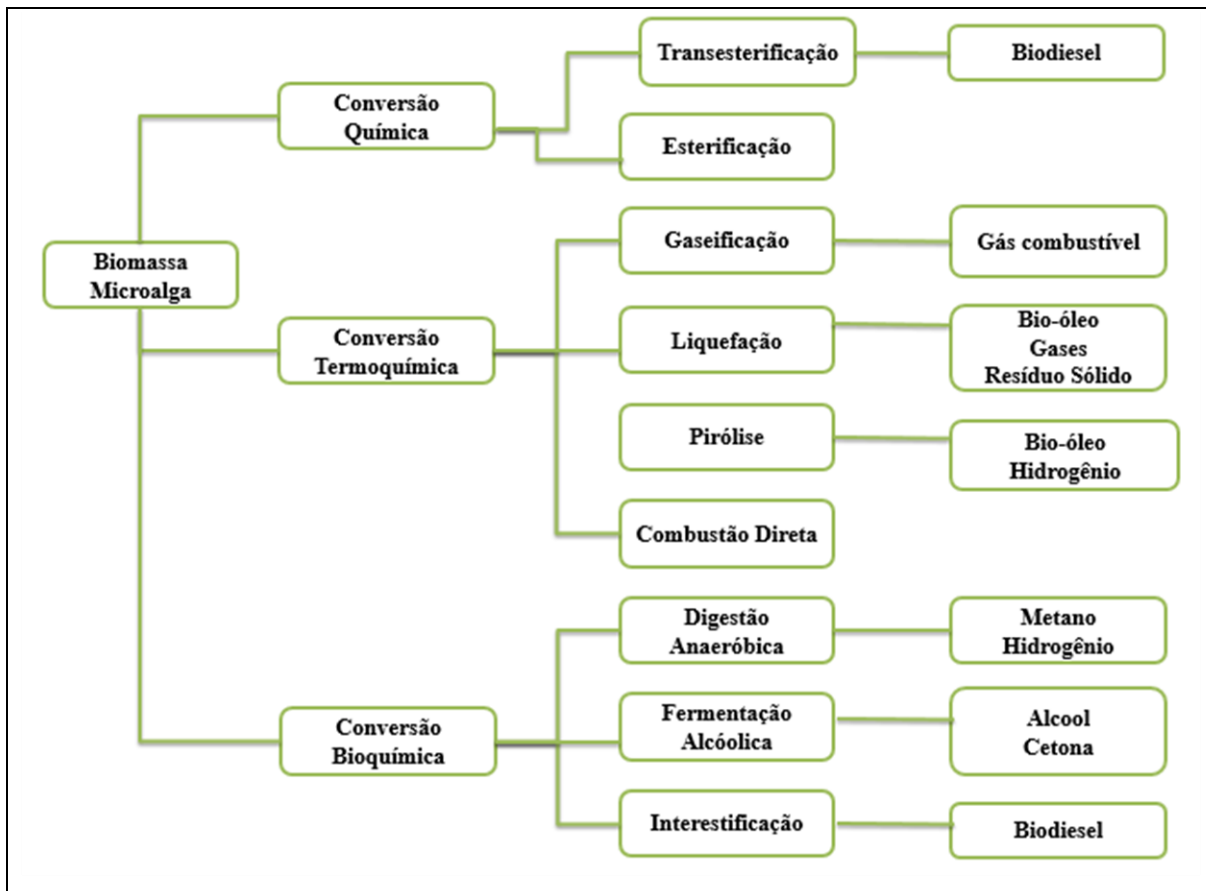
Existem vários tipos de lipídios e de ácidos graxos produzidos pelas microalgas que podem ser extraídos para a produção de biocombustíveis. O método de extração de lipídios e eficiência são altamente dependentes das espécies de microalgas e da sua composição química. Os métodos que geralmente são mais utilizados no processo de extração de lipídeos das microalgas são físicos, química com um solvente orgânico, e métodos de supercríticos. Sendo a extração com solventes (hexano e metanol) a mais utilizada na obtenção dos óleos para conversão química em biodiesel por serem mais econômicos. (BRENNAN L; OWENDE, 2010; ALAM, 2012; SUALI; SARBATLY, 2012 RASHID ET AL., 2014; ZIOLKOWSKA, 2014).

2.11 Processo de conversão para produção de biocombustíveis

A biomassa produzida a partir de microalgas pode ser convertida em biocombustíveis através de diferentes maneiras.

A conversão de biomassa em os biocombustíveis pode ser classificada em três subclasses: química, bioquímica e termoquímica que são mostradas na Figura 2-9. A seleção adequada dos métodos de conversão é determinada pela quantidade de biomassa obtida, a forma de energia final desejada e de viabilidade econômica (VELASQUEZ-ORTA; LEE, 2012; ZENG; DANQUAH, 2011, JOHNSON; WEN, 2009; ZIOLKOWSKA, 2014).

Figura 2-9 Processos de conversão de bicomcombustíveis



Fonte: ZIOLKOWSKA, SIMON, et al., 2014

2.12 Produção de biodiesel

A transesterificação é considerada a melhor rota para a utilização dos óleos vegetais como alternativa ao diesel fóssil, pois confere ao produto (biodiesel) características como viscosidade e índice de cetano muito próximas das do diesel (SUAREZ et al, 2009).

A Transesterificação química é o método mais usado no processo de obtenção do biodiesel a partir do óleo microbiano. Os métodos mais comuns utilizados para obtenção de biodiesel consistem na transesterificação de triglicerídeos ou a esterificação de ácidos graxos livres com álcoois de baixa massa molecular na presença de um catalisador adequado (FARAG; EL-MAGHRABY; TAHA, 2011).

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. O índice de acidez é a principal característica do óleo utilizado a ser observado na escolha do catalisador (DEMIRBAS, 2010).

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 no quadro 2-8 que destaca o processo de síntese de biodiesel utilizado por alguns pesquisadores.

Quadro 2- 8 Síntese do biodiesel da microalga chlorella

Microalga	Catalisador	Referência
<i>Chlorella sp</i>	H ₂ SO ₄	AMARAL et. al, 2015
<i>Chlorella sp</i>	H ₂ SO ₄	LEMOES , 2011
<i>Chlorella</i>	H ₂ SO ₄	EHIMEM et. al, 2010
<i>Chlorella protothecoides</i>	H ₂ SO ₄	MIAO 2006

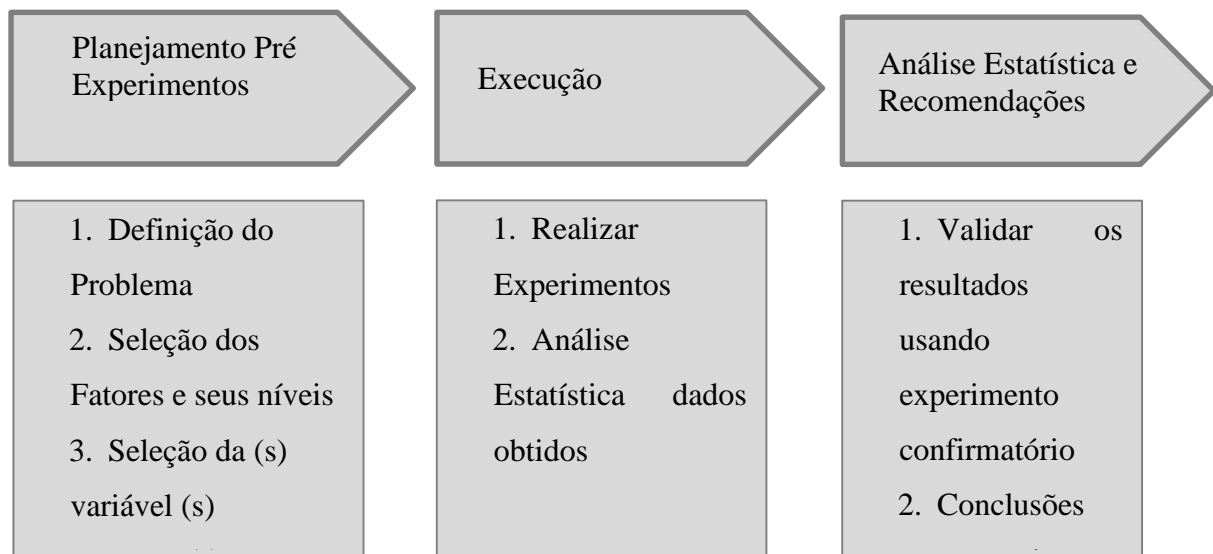
Fonte: Próprio autor

2.13 Planejamento de Experimentos (DOE – *Design of Experiment*)

O planejamento ou delineamento de experimentos (DOE) é considerado, entre os métodos estatísticos o mais apropriado para investigação de variáveis influentes em processos. O planejamento experimental é um método estruturado e organizado, utilizado na determinação de diferentes fatores de entrada e saída do processo, envolvendo a definição do conjunto de experimentos, nos quais todos os fatores relevantes são variados sistematicamente (HARIDY et al., 2011). Este método representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis de entrada em determinadas variáveis de resposta indicando as melhores condições experimentais na tentativa de aumentar a escala de produção bem como a melhoria da qualidade de bens e serviços com a maior precisão estatística ao menor

custo possível. (BUTTON, 2005; ARANDA, 2008; SILVA E SILVA 2008; SOUZA et al., 2011). A Figura 2- representa as fases de implementação de DOE

Figura 2-10 Representação das principais fases para implementação DOE FASES



Fonte: Adaptado de Farooq et al. ,2015

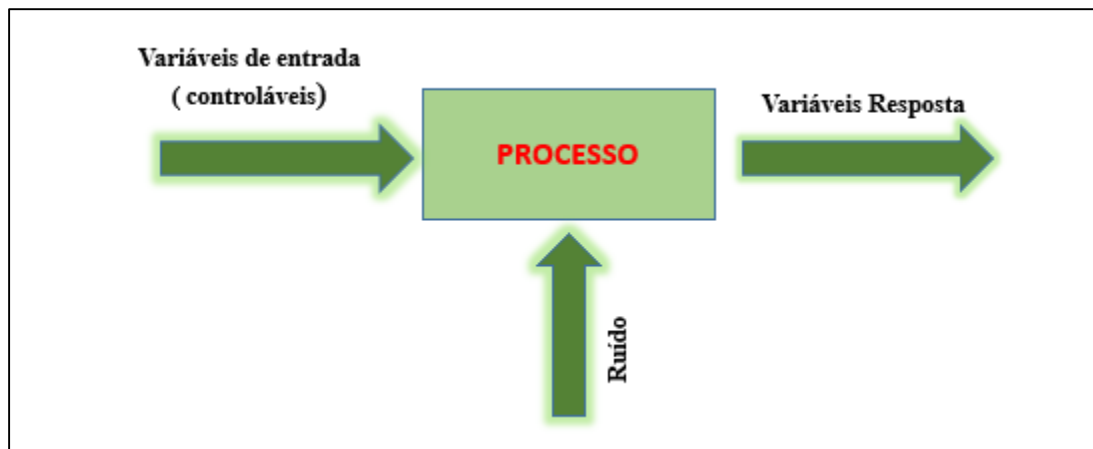
2.14 Método de Taguchi

Genichi Taguchi introduziu o importante conceito na literatura em experimentos chamado de fatores de ruído ou fatores incontroláveis, a percepção de Taguchi foi notar que esses fatores podem em muitos casos ser controláveis (variáveis). Experimentos são realizados modificando os fatores de controle, assim obtém o desenvolvimento de um modelo em que as respostas são uma função de ambos os fatores controláveis e os fatores de ruído. O termo robusto consiste em utilizar esse modelo para otimizar os fatores controláveis, de tal forma que a solução é insensível ou robusta as variações dos fatores de ruído, os fatores de controle são os Parâmetros do Projeto Robusto enquanto os ruídos são fatores não controláveis ou cujo custo de controle seja oneroso (PHADKE,1989; CASTILHO, 2007).

O método de Taguchi é uma ferramenta de resolução de problema de vários tipos de processo, que visa melhorar a qualidade de produtos bem como a diminuição no custo do tempo experimental. Este método tem como objetivo resolver vários problemas de qualidade

nas indústrias, propondo os melhores ajustes dos fatores de controle de um produto (XIANSHENG, 2011). Na Figura 2-11 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).

Figura 2-11 Fatores influentes em um processo



Fonte: Adaptado de Yang; Hwang; Lee, 2002

A quantidade de experimentos pode ser reduzida para um nível prático, por isso uma escolha é necessária para identificar os fatores mais representativos sobre a variável resposta. As matrizes ortogonais de Taguchi é um dos meios mais eficientes para identificar a importância dos fatores, realizando um número reduzido de experimentos (WANG e HUANG, 2015).

O projeto experimental de Taguchi é um arranjo ortogonal para organizar os parâmetros que afetam o processo. Determina os fatores que afetam a qualidade do produto. O método experimental de Taguchi investiga como os parâmetros afetam o desempenho do processo em estudo (KISHORE et al., 2009).

Taguchi de acordo com o trabalho de Para Rana et al. (2014), relata que o método é um tipo especial de matriz que se pode empregar em várias situações, no qual a quantidade de colunas das matrizes é número máximo de fatores que podem ser estudados.

Uma matriz ortogonal é um projeto experimental construído para permitir uma avaliação matemática independente do efeito de cada um dos fatores, permitindo assim analisar os dados coletados de forma eficiente (TANSEL et al., 2011). Logo, essa ferramenta

matemática é utilizada para a otimização de processos e produtos (PANDEY e PANDA, 2015). O método de Taguchi, em sendo muito utilizado na otimização de processos como uma das mais importantes ferramentas do planejamento de experimento (TANSEL et al. 2011). O quadro 2-9 apresenta de forma resumida de características e aplicações do Método de Taguchi.

Quadro 2- 9 Características fundamentais do Método de Taguchi

Planejamento Experimental	Característica	Aplicações
Taguchi	Permite a análise de um processo com muitas variáveis de entrada com um número extremamente reduzido de experimentos. Fornece uma ideia do processo.	Processos no qual há pouco ou quase nenhum conhecimento prévio de comportamento. Processos com alta dispersão ou que os experimentos demandem alto custo ou tempo.

2.14.1 Razão Sinal/Ruído

O método Taguchi utiliza a razão S/N para investigar a variação da resposta, resultando na redução da variação da característica de qualidade. De acordo com as características da relação S/N, Taguchi ainda classificou as características de desempenho em três categorias (EQUAÇÕES 1, 2 e 3) (JANG, YE e JIANG 2015):

2.14.2 Menor é o Melhor

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\frac{\sum_{i=1}^n Y_i^2}{n} \right) \quad (1)$$

Sendo n é o número de respostas observadas para cada condição experimental, e Y_i sendo o valor da resposta na dada condição experimental, com i inteiro positivo.

2.14.3 Maior é o Melhor

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left[\sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{n} \right) \left(\frac{1}{Y_i^2} \right) \right] \quad (2)$$

2.14.4 Nominal é o Melhor

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\frac{\bar{Y}^2}{S^2} \right) \quad (3)$$

$$\text{Onde } \bar{Y} = \frac{Y_i}{n} \text{ e } S = \frac{1}{n-1} \cdot \sum (Y_i - \bar{Y})^2$$

A relação (S/N) consiste num resultado que concentra as repetições e o efeito dos níveis de ruído em um único valor observado, ou seja, pode refletir tanto a média quanto a variação (dispersão) das características qualitativas sob uma condição julgamento (RANA et al., 2014).

A ANOVA é um método estatístico complementar ao Planejamento de experimentos, utilizado para interpretar os dados experimentais, nas tomadas de decisões, e para testar estatisticamente as médias dos resultados em suas diferentes condições (MONTGOMERY; RUNGER, 2009).

Para analisar estatisticamente os resultados obtidos por meio de Planejamento de Experimentos, o método mais recomendado é a Análise de variância (ANOVA), por meio da qual, podem-se comparar dois ou mais fatores e também testar a significância da regressão, fazendo uso do teste F para comprovar quais os fatores e interações entre eles são realmente significantes no processo.

A partir dos parâmetros calculados na ANOVA é possível criar e/ou validar modelos estatísticos, assim como, calcular os coeficientes necessários para modelagem do processo.

Alguns trabalhos de pesquisa como, AMARAL et al., 2015; Silva et al., 2014; Souza et al., 2013 e Freitas et al., 2011 obtiveram bons resultados, utilizando o Método de Taguchi. As melhorias obtidas por estes autores em suas pesquisas serão descritas de forma sucinta.

AMARAL et al. (2015) utilizou o método e Taguchi, matriz L8 para determinar quais os fatores mais influentes no processo de cultivo da microalga *Chlorella sp.* Os fatores estudados foram: intensidade de luz (0,85 e 14,5 klux), CO₂ (5 e 10%), NaNO₃ (0,025 e 0,075 g L⁻¹) De acordo com o delineamento experimental influenciou no crescimento celular atingindo uma boa produtividade de biomassa quando utilizou 0,85 klux de intensidade luz, 5% de CO₂ e 0,075 g de L⁻¹ de NaNO₃, já a produção de lipídeos foi influenciada quando a concentração de NaNO₃ foi de 0,025 g L⁻¹.

Silva et al (2014) aplicou o método de Taguchi, para otimizar as condições de tratamento de efluente de resina de poliéster por meio de processos de oxidação avançada (POAs), utilizando a demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetro de resposta. Os resultados mostraram que o método Taguchi é uma ferramenta muito útil para a área de engenharia ambiental pois permitiu determinar as variáveis e condições mais significativas para melhor atender o processo.

Souza et al (2013) utilizou planejamento de experimentos afim de encontrar o ponto ótimo proporcional a maior taxa de degradação da matéria orgânica presente em chorume. A variável resposta analisada foi a concentração do Carbono Orgânico Dissolvido (DOC). Foram utilizados dois planejamentos exploratórios variando a vazão de O₂ alimentada ao gerador, concentração de ferro (III) e potência do ozonizador, a fim de encontrar o ponto ótimo proporcional a maior taxa de degradação da matéria orgânica. Nestes planejamentos exploratórios foi possível se atingir uma porcentagem de degradação de DOC da ordem de 81,25 %.

Freitas et al. (2011) elaborou um estudo estatístico utilizando o método de Taguchi para determinar os fatores com efeitos significantes na análise dos resultados da degradação da carga orgânica de efluentes têxteis, obtendo como resposta um percentual de redução na DQO, que atende a legislação vigente (SABESP/CONAMA).

2.15 Otimização

O uso de técnicas de otimização vem sendo muito utilizadas para resolver problemas tais como, encurtar um caminho para ganhar tempo, economizar para comprar algo, tomar decisão com base em investimentos, sempre estamos interessados nas formas ótimas de aplicarmos nossos recursos (PHOLDEE e BUREERAT, 2014).

Porém é importante ressaltar que um processo de otimização não implica necessariamente na determinação das condições ótimas de operação, uma vez que fica praticamente impossível de estabelecer o ponto ótimo em função de uma quantidade ilimitada de variáveis que impactam em um processo (DEHURI e CHO, 2009).

Ao invés disso, o que se pode determinar são condições de melhorias a partir da seleção de pontos que maximizem algo ou minimizem algo determinados dentro de um espaço de busca pré-determinadas (DEHURI e CHO, 2009).

Processos reais precisam ser otimizados com relação a vários critérios simultaneamente. Frequentemente, as condições de operação precisam satisfazer várias condições ou restrições por exemplo, na concepção de um novo produto, especificações do produto têm de ser satisfeitas as quais determinam o desempenho do produto durante a utilização. Em um processo de fabricação, há sempre pelo menos duas respostas de interesse em cada processo (CASTILHO, 2007).

Ao se tratar de processos ou produtos que possuam múltiplos atributos de qualidade, é sempre difícil se encontrar um conjunto de parâmetros ótimos para todas as características de interesse a partir da otimização individual de cada função (WU, 20050). Em otimização multiobjectivo não há, normalmente, nenhuma solução que seja ideal para todos os objetivos impostos. Consequentemente, a situação normal é que qualquer solução pode ser sempre melhorada em pelo menos um objetivo (BAZGAN, *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, o uso do método de aglutinação multi-objetivo, tal como função *Desirability* vem sendo utilizada para encontrar soluções de melhoria em bioprocessos visando uma maior eficiência e economia no processo. No entanto, poucos estudos têm sido realizados utilizando otimização multi-objetivo para melhorar de forma eficiente o rendimento de um desejado produto metabólico num sistema microbiano, ou seja, atingir elevadas produtividades de biomassa e lipídios (ABDELAZIZ et al., 2014)

2.15.1 Função DESIRABILITY

O método *Desirability* é uma função aglutinadora 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; MONTGOMERY *et al.*, 1996).

A função “*Desirability*” é definida como uma abordagem que consiste em traduzir o desempenho de produtos ou processos em valores d_i que estejam dentro de um intervalo de $0 \leq d_i \leq 1$ (POROCH-SERITAN *et al.*, 2011). O quadro 2-10 apresenta os objetivos da otimização no Método de Derringer.

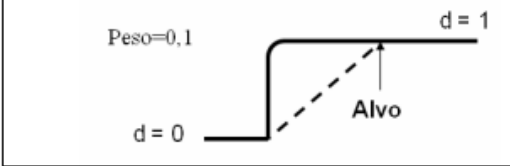

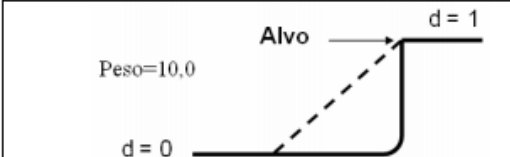
Quadro 2- 10 Objetivos de otimização no Método de Derringer

Objetivo	Características	Representação Esquemática
Minimizar	O valor da função <i>desirability</i> aumenta enquanto que o valor da resposta original se aproxima de um valor alvo mínimo. Abaixo do alvo, $d = 1$; acima do limite superior, $d = 0$	
Normalizar	Quando a resposta se move em direção alvo, o valor da função <i>desirability</i> aumenta. Acima ou abaixo dos limites, $d = 0$; no alvo $d = 1$.	
Maximizar	O valor da função <i>desirability</i> aumenta quando o valor da resposta aumenta. Abaixo do limite inferior, $d = 0$; acima do alvo, $d = 1$.	

Um processo pode não atingir suas metas e ficar fora de seus limites de especificação, no qual pode receber um valor igual a 'zero'. Os processos que operam entre os limites de especificação, mas não atingem o valor alvo, recebem valores entre o intervalo $0 \leq d_i \leq 1$ (WU, 2005).

As funções *desirability* individuais são calculadas como a média geométrica ponderada entre os valores d_i individuais, ou seja, de cada variável resposta. Logo, o problema multiobjectivo é reduzido a um único critério de otimização (KARATAPANIS et al., 2011). O quadro 2-10 demonstra os objetivos de otimização no Método de Derringer e o quadro 2-11 demonstra as relações de importância entre o Alvo e os Limites no *Desirability* (PAIVA, 2006).

Quadro 2- 11 Relações de importância entre o Alvo e os Limites no *Desirability*

	<p>Se o peso é menor que 1 (valor mínimo é 0,1), então, menos ênfase se dá ao alvo.</p>
	<p>Quando o peso é igual a 1, a importância dada ao alvo é igual à importância dada aos limites.</p>
	<p>Se o peso dado à resposta é maior do que 1 (o valor máximo é 10), então, mais ênfase é dada ao alvo.</p>

Fonte: PAIVA, 2006

Segundo Derringer e Suich (1980), a otimização dependerá do tipo de resposta desejada (maximização, normalização ou minimização), dos limites desejados dentro da especificação e das importâncias (pesos) de cada uma das respostas. As principais características dos diferentes tipos de otimização são definidas em três classes das funções em três diferentes tipos de variáveis de resposta que são: NTB, STB e LTB. Para o tipo (*Nominal the Best*) NTB, onde possui as duas restrições: máximo e mínimo para se atingir um valor alvo (Equação 4):

$$d_i = \begin{cases} \left[\frac{\hat{Y}_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s, & L_i \leq \hat{Y}_i \leq T_i \\ \left[\frac{\hat{Y}_i - L_s}{T_i - L_s} \right]^t, & T_i \leq \hat{Y}_i \leq L_s \\ 0, & \hat{Y}_i < L_i \text{ ou } \hat{Y}_i > L_s \end{cases} \quad (4)$$

Sendo s e t são valores preponderantes da função *Desirability* onde de uma maneira geral são valores entre 0,01 e 10, L_i e L_s são limites inferiores e superiores respectivamente do especificado para a i -ésima resposta e T_i é o valor alvo.

Na condição (*Smaller the Best*) STB se procura minimizar a variável resposta, a função *Desirability* é definida pela Equação 5:

$$d_i = \begin{cases} 0, \\ \left[\frac{\hat{Y}_i - L_s}{a - L_s} \right]^t, & a \leq \hat{Y}_i \leq L_s \\ 1, \end{cases} \quad (5)$$

Isto é, se quisermos encontrar os níveis dos fatores que levam a um valor máximo a variável resposta é preciso definir $d_i = 1$ para valores altos e $d_i = 0$ para valores baixos da variável resposta. Por outro lado, se o desejado é um valor mínimo da variável resposta, deve-se definir $d_i = 0$ para valores altos e $d_i = 1$ para valores baixos da variável resposta (VASUDEVAN *et al*, 2014).

Sendo a é o menor valor possível para a variável resposta \hat{Y}_i .

E na deseja a maximização da variável resposta (*Larger the Best*) LTB, a fórmula de transformação empregada é dada pela Equação 6

$$d_i = \begin{cases} \left[\frac{\hat{Y}_i - L_i}{L_s - L_i} \right]^s, & L_i \leq \hat{Y}_i \leq L_s \\ 0, & \hat{Y}_i < L_i \\ 1, & \hat{Y}_i > L_s \end{cases} \quad (6)$$

No caso em que cada variável resposta representa um valor d_i , então a função *DesirabilityD* é calculada pela combinação das respostas, tal como descreve a Equação 7 (PAL e GAURI (2010)).

$$D = (d_1(Y_1) \cdot d_2(Y_2) \cdot \dots \cdot d_k(Y_k))^{\frac{1}{k}} \quad (7)$$

Por fim, vale destacar que a função *Desirability* é uma técnica que pode fornecer uma visão do desempenho global de um processo específico, considerando diferentes métricas, onde o objetivo comum é sempre alcançar as metas propostas, sendo um meio eficaz de uma otimização simultânea de um problema com múltiplas respostas (RAISSI; FARSANI, 2009).

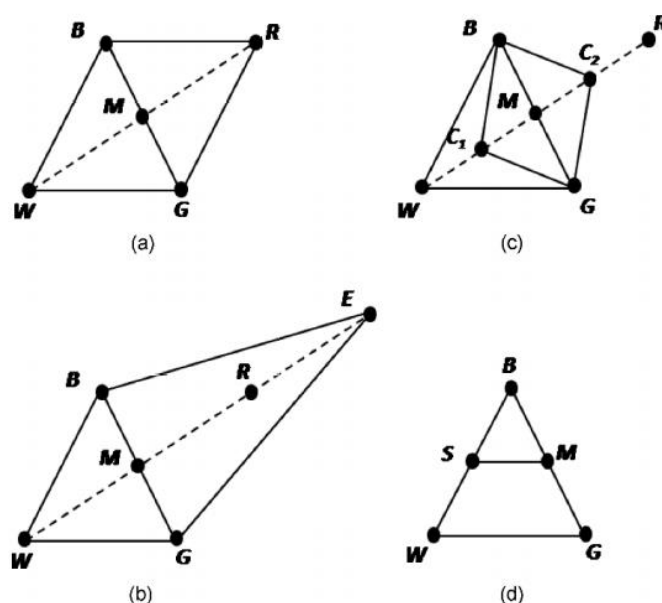
KANAGA et al. (2016) utilizaram a função desirability para otimizar produção de biomassa e lipídeos de microalga *Chlorella Pyrenoidosa* NCIM 2738. A condição otimizada para acúmulo de lipídios, produção de biomassa foram observadas 28,9%, 1271,2 mg L⁻¹ respectivamente no nível ótimo de NaNO₃.

2.15.2 ALGORITMO NELDER-MEAD SIMPLEX

O Algoritmo Nelder Mead Simplex tornou-se um dos métodos mais utilizados para otimização de funções não lineares sem restrições, desde sua publicação em 1965 (NELDER e MEAD, 1965). O Método de Nelder Mead destina-se a otimização sem restrições não podendo ser confundido com o Algoritmo Simplex que é muito utilizado em programação linear (LAGARIAS *et al.*, 1998). O Algoritmo de Nelder-Mead foi proposto como um método para minimizar o custo de uma função $f(x)$ para $x \in R^n$. O método utiliza o conceito de um simplex, que é um poliedro especial de $N + 1$ vértices em N dimensões (RAJAN e MALAKAR, 2014). O algoritmo é um processo para gerar uma sequência de triângulos, para as quais os valores da função objetivo em cada um dos vértices ficam cada vez menores. Cada iteração do algoritmo irá reduzir o tamanho dos triângulos que convergem para as coordenadas do ponto mínimo. O processo do nosso método de substituição consiste em quatro operações básicas: reflexão, expansão, contração, e múltipla contração, como mostrado na Figura 2-. No início do algoritmo, que a entrada de três conjuntos de valores iniciais, e as equações de taxa são resolvidos utilizando a quarta ordem Runge- Kutta. Os conjuntos de valores iniciais formarão os três vértices de um triângulo. Estes vértices são classificados de acordo com o valor da função objetivo e classificados de maneira que B é o melhor vértice, G é um bom vértice (a próxima melhor), e W é o pior vértice. Após o ranking

dos vértices, nosso algoritmo começa a substituir o vértice W por uma estimativa melhor. Quatro operações básicas do método Simplex de Nelder Mead. (a) Reflexão usando o ponto R; (b) expansão usando o ponto E; (c) contração usando o ponto C; e (d) Múltipla Contração na direção de B. A Figura 2- apresenta um pseudocódigo do algoritmo de Nelder Mead Simplex.

Figura 2-12 Pseudocódigo do algoritmo de Nelder Mead Simplex



A figura 2-13 apresenta o Pseudocódigo do algoritmo de Nelder Mead Simplex, gerado no software Scilab. O Scilab, é um software científico usado para computação numérica que fornece ao usuário um ambiente computacional aberto para aplicações científicas e em engenharia, é um dos softwares livres mais utilizados. O Scilab vem se tornando uma alternativa extremamente viável no ensino da engenharia visto que, o alto custo de software como o Matlab, dificulta sua utilização. O Scilab inclui grande número de bibliotecas que englobam funções gráficas, integração numérica, álgebra linear, otimização e outras (AUGUSTO, 2007).

Figura 2-13 Pseudocódigo do algoritmo de Nelder Mead Simplex

```

Algoritmo Nelder Mead
    Gere uma solução inicial  $(x_1, y_1)$ ,  $(x_2, y_2)$  e  $(x_3, y_3)$ 
classifique as soluções com B, G e W
    Calcule  $M = (B+G)/2$ 
    Calcule  $R = 2*M-W$ 
enquanto (critério de parada não for satisfeito) faça
se  $f(R) < f(W)$  então
    Substitua W por R
    Calcule  $C = (M+R)/2$  e  $f(C)$ 
se  $f(C) < f(W)$  então
    substitua W por C
senão
    Calcule a solução final
fim-se
fim-se
fim-enquanto
fim-algoritmo

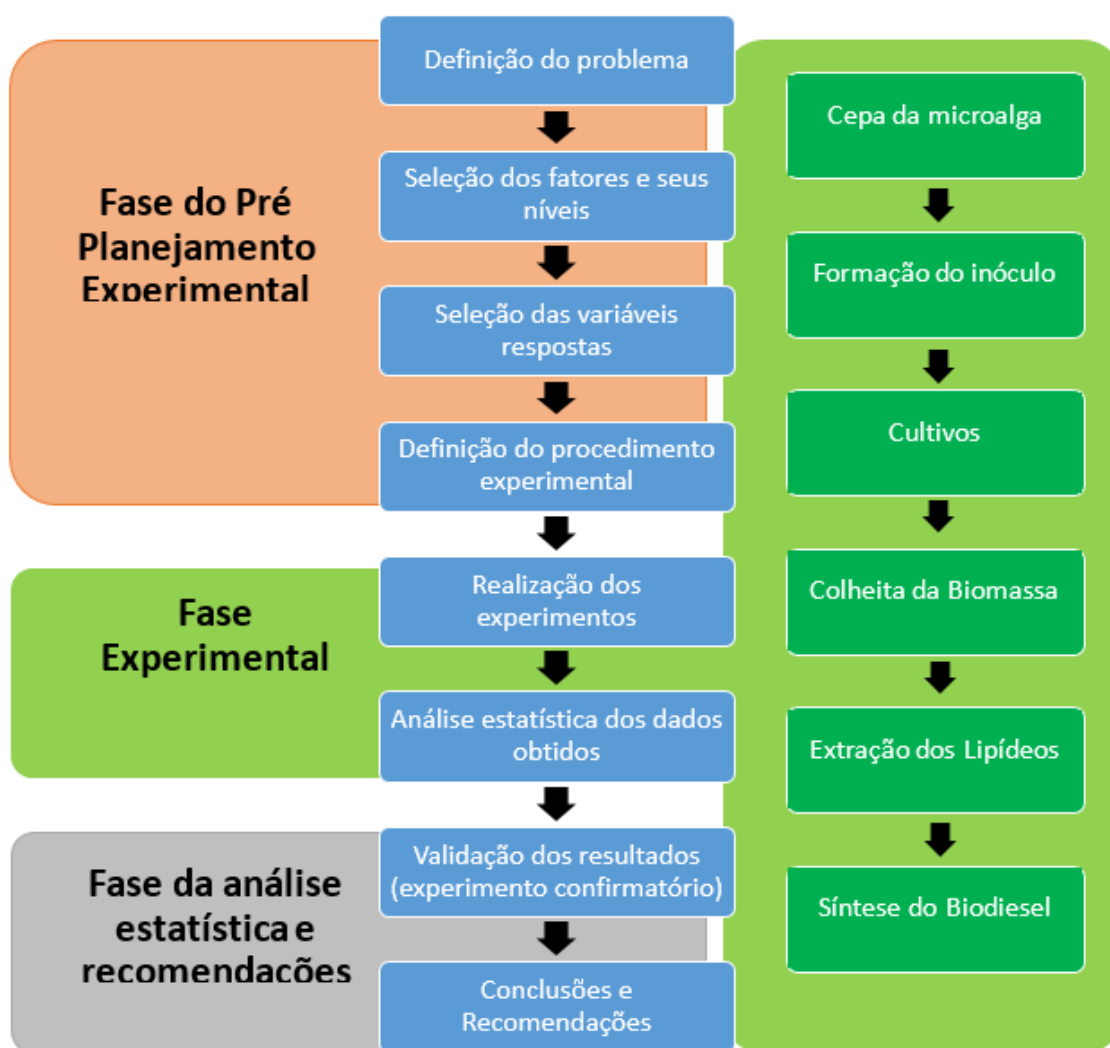
```

Fonte: Gomes, 2015

3 MATERIAL e MÉTODOS

O desenvolvimento sistemático da etapa experimental deste trabalho pode ser representado pelo fluxograma que contém as principais atividades para a realização da pesquisa, conforme ilustra a Figura 3-1. A primeira etapa é a fase do Pré planejamento experimental seguido pela fase de execução dos experimentos e por fim, a fase de análise dos dados seguidos pelas recomendações.

Figura 3-1 Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na pesquisa



Fonte: Próprio autor

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

3.1.1 Linhagem da microalga

Neste estudo foi utilizada a linhagem da microalga marinha *Chlorella minutissima*, pertencente ao Banco de Algas Marinhas do Instituto Oceanográfico da USP, gentilmente doada pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo a qual foi cultivada no Laboratório de Meio Ambiente da Escola de Engenharia de Lorena - USP.

3.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução dos experimentos e na preparação dos meios de cultura foram de grau padrão analítico para microbiologia, que permite menor variabilidade e maior precisão no meio de cultivo. A tabela 3-1 apresenta os reagentes que compõem o meio f/2.

Tabela 3- 1 Reagentes utilizados na Composição do meio f/2

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

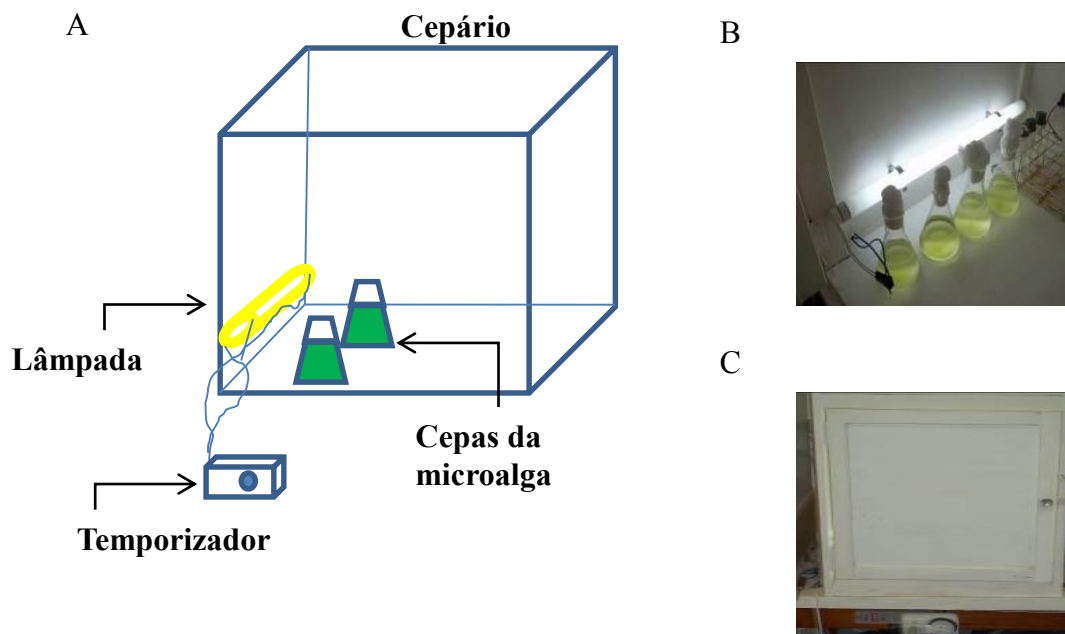
Fonte:(GUILLARD, 1975^{apud} LOURENÇO, 2006)

O meio de cultivo (f/2), largamente utilizado em pesquisas com microalgas marinhas, foi utilizado para manutenção do banco de células, preparação de inóculos e também nos experimentos para a obtenção de biomassa. Para o preparo do meio de cultivo foi utilizada sempre água destilada. Os reagentes utilizados e a composição padrão do meio f/2 sem sílica podem ser visualizados na tabela 3-1 (GUILLARD, 1975).

3.1.3 Manutenção da cepa

Para a manutenção da cepa foi confeccionada uma caixa de madeira provida com uma lâmpada fluorescente de 15W ligada a um temporizador que controla o fotoperíodo em 12 h: 12 h luz/escuro, na qual volumes de 100 mL da cepa microalgal são cultivadas em meio f/2 sem sílica, a fim de fornecer células durante todo o período de experimentos. A Figura 3-2 ilustra o equipamento utilizado para a manutenção da cepa.

Figura 3-2 A- Desenho esquemático do cepário. B- Imagem dos frascos para manutenção da cepa. C- Imagem do cepário.



Fonte: Amaral, 2014

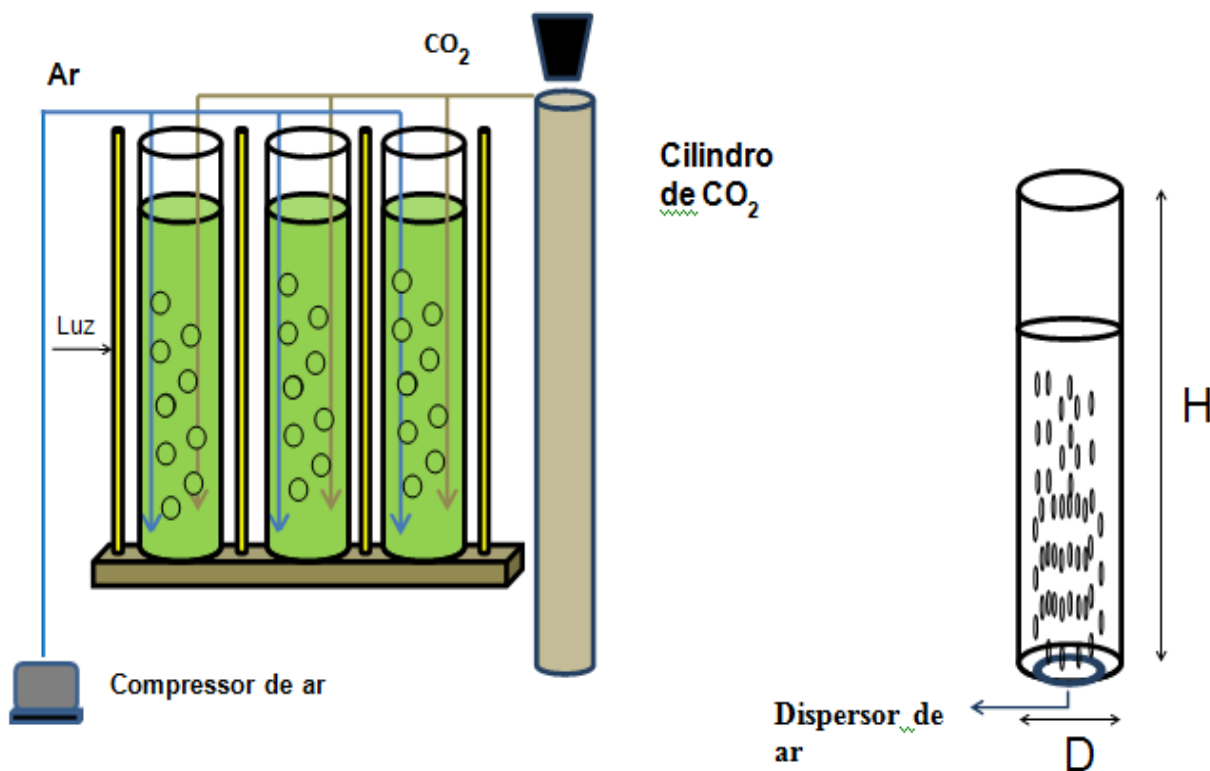
3.1.4 Construção do fotobiorreator do tipo coluna de bolhas

Para o presente trabalho, a microalga marinha *Chlorella minutíssima* foi cultivada num sistema composto por seis fotobiorreatores (coluna de bolhas) dispostos em dois blocos, um bloco com três fotobiorreatores de 18L e outro com três de 44L fotobiorreatores, dotados de iluminação externa e agitação pneumática.

O fotobiorreator tipo coluna de bolhas foi construído em escala de bancada, composto por 3 tubos de material acrílico com diâmetro interno - 184 mm, altura - 2033mm e por 3 tubos de material acrílico com diâmetro interno - 135 mm, altura - 1200mm e 5,0 mm de espessura da parede e um volume de 50 e 20 L por tubo respectivamente, dispostos em blocos, perfazendo volume total de trabalho de 132 e 54 L. O sistema de aeração foi mantido utilizando um difusor (do tipo “pedra porosa” de formato anelar, com 13,5cm de diâmetro) alocado na base do centro do tubo, conectado por mangueira de silicone a um compressor de ar diafragmático com vazão de 2 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) para dispersão de microbolhas de ar no sistema. A alimentação do CO₂ do meio foi de 4,0% em relação à vazão de ar do meio (2,0 vvm), introduzida no sistema através de fluxômetro para controle de vazão do gás. Foi utilizada uma válvula solenóide para controle da injeção de CO₂ no sistema.

Os cultivos foram realizados em triplicata nos fotobiorreatores de acrílico. O volume útil de trabalho foi de 18 L para cada coluna de 18L e 44L para cada coluna de 50L e agitação pneumática foi fornecida por um compressor de ar BOYU (modelo ACQ-003). O gás CO₂ comprimido em cilindros industriais foi utilizado concomitantemente à vazão de ar durante a aeração do fotobiorreator, quando requerido como fonte de carbono, de acordo com o planejamento experimental. O aparato experimental foi mantido em sala climatizada e isolada de luz difusa, no laboratório de engenharia de microalgas da Escola de Engenharia de Lorena. A temperatura da sala foi mantida constante por um aparelho de ar-condicionado tipo quente/frio. A iluminância foi 150 Lux, fornecida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W, tipo luz do dia, medida através de luxímetro digital. A concentração do inoculo foi de 10% (v/v). As Figura 3-3 e 3-4 apresentam respectivamente o desenho esquemático e a foto do fotobiorreator do tipo coluna de bolhas de 50 L, que foi utilizado no presente trabalho de pesquisa.

Figura 3-3 Desenho esquemático do fotobiorreator do tipo coluna de bolhas



Fonte: Própria

Figura 3-4 Sistema de fotobiorreatores: Laboratório Engenharia de Microalgas (eel-usp)



Fonte: Própria

3.1.5 Método de desinfecção da água e dos fotobiorreatores

Os fotobiorreatores foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio comercial (2 a 3% de cloro ativo) durante 2 h e então enxaguados com água da torneira. Os reatores foram completados com 186 L de água da torneira e 10,2 ml de solução de hipoclorito de sódio (12% de cloro ativo) foram adicionados para desinfecção. A solução foi mantida em repouso no escuro por 12 h, seguida de 2 h de aeração para a remoção do cloro residual antes da sua inoculação (adaptado de MOHEIMANI & BOROWITZKA, 2006). O mesmo procedimento foi realizado com as mangueiras de borracha com microfuros para agitação do meio de cultivo.

3.1.6 Colheita da biomassa

Após cada cultivo a biomassa foi recuperada por floculação induzida por solução 1N de sulfato de alumínio. O processo de floculação se deu pela adição de 2 mL da solução de floculante para cada 1L de meio de cultivo a fim de se obter a formação dos flocos celulares. Após a total floculação, será efetuada a filtração do conteúdo em papel de filtro qualitativo para a retenção da biomassa úmida. Em seguida a biomassa foi lavada com solução 6M de formiato de amônio para a retirada do sal marinho utilizado no cultivo. A Figura 3-5 apresenta colheita da biomassa por meio do processo de floculação bem como a sua filtração.

Figura 3-5 Biomassa flokulada e filtrada



Fonte: Proprio Autor

3.1.7 Determinações analíticas

3.1.7.1 Determinação da biomassa por turbidimetria e contagem celular

As amostras foram coletadas periodicamente em condições assépticas para determinação da biomassa, calculada através da densidade óptica ($\lambda=690$ nm), em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Bel Photonics), com auxílio de curva de calibração pré-determinada. A contagem celular foi realizada utilizando um microscópio (modelo BIOVAL) com o auxílio de um hemacitômetro, tipo câmara de Neubauer, de 0,1 mm de profundidade (LOURENÇO, 2006). Os dois métodos foram relacionados por meio de curva de calibração para acompanhar o crescimento celular.

3.1.7.2 Determinação de lipídios totais

Os de lipídios totais foram quantificados segundo metodologia de Bligh & Dyer modificada, (BLIGH and DYER 1959; BRUM, ARRUDA & REGITANO- D`ARCE, 2009; RAJAN, PATIL & MOHOLKAR, 2010). Os lipídeos foram extraídos de amostras de 1 g da biomassa liofilizada. Inicialmente foi adicionado solvente à biomassa na seguinte ordem: clorofórmio, metanol, água 1:2:0,8 (v/v/v). As amostras foram

agitadas por alguns minutos até completa homogeneização dos solventes. Na sequência a mistura foi colocada em banho de ultrassom por 1 hora. A separação das fases foi realizada em funil de separação adicionando-se clorofórmio e água para obtenção de separação da fase apolar (lipídica) e polar. A Figura 3-6 demonstra o esquema usado no rompimento da parede celular em banho de ultrassom bem como a separação das fases polar e apolar na obtenção dos lipídios. Os lipídios foram extraídos utilizando metodologia de Bligh Dyer adaptada, com o auxílio de ultrassom para facilitar a ruptura da parede celular.

Figura 3-6 Esquema utilizado na ruptura das células obtenção do óleo



Fonte: Proprio Autor

3.1.7.3 Determinação do peso seco

A umidade da biomassa filtrada foi determinada por um detector de umidade Marte, modelo ID50, utilizando-se 0,1 g de amostra.

3.1.7.4 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).

3.1.7.5 Determinação da Viscosidade

Os valores de viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP52. As medidas foram feitas em duplicata a 50°C, empregando 1mL de amostra. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (Equação 8), conforme descrito por De Nevers, 2005, para verificação de possíveis desvios do comportamento Newtoniano. Em que: τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

$$\tau = K \times \dot{\gamma}^n \quad (8)$$

3.1.7.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA da amostra de óleo da Microalga foi realizada empregando balança termogravimétrica (Shimadzu TGA 50), adotando as seguintes condições de análise: fluxo de 50mL/min de nitrogênio, taxa de aquecimento de 10°C/min na faixa de aquecimento de 25 a1000°C.

3.1.7.7 Síntese e Quantificação 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 H₂SO₄ como catalisador a temperatura de 60°C por 6h.

A conversão dos triglicerídeos em ésteres obtidos por via química foi determinada tomando-se por base os dados gerados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), utilizando-se a metodologia descrita por Carvalho (2011). Como pode ser observado na Figura 3-7, 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 triglicerídidos.

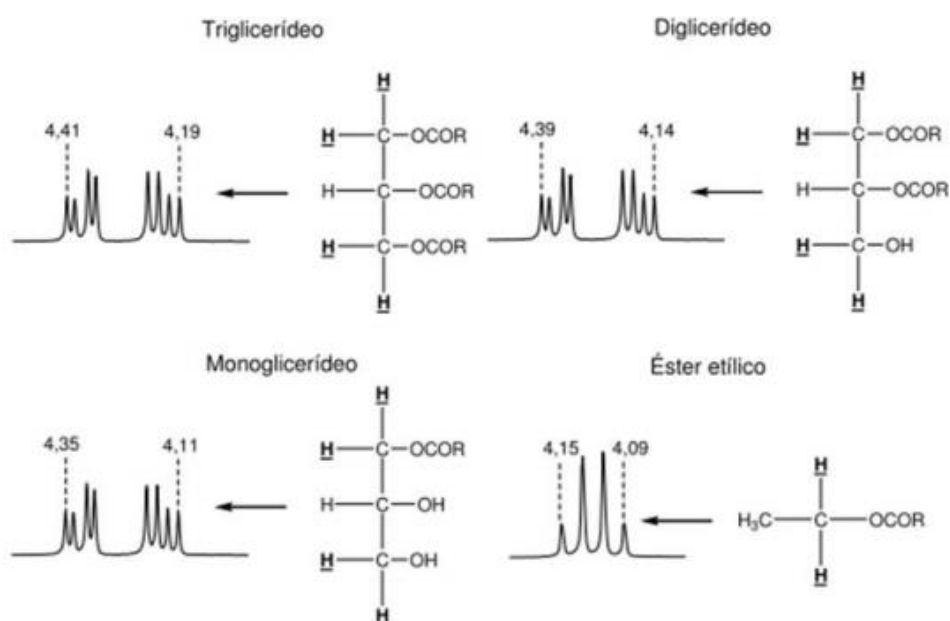


Figura 3-7 Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ¹H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos (GARCIA, 2006).

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 —sentel 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 3-8.

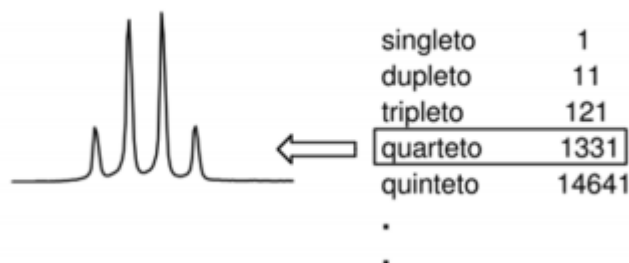
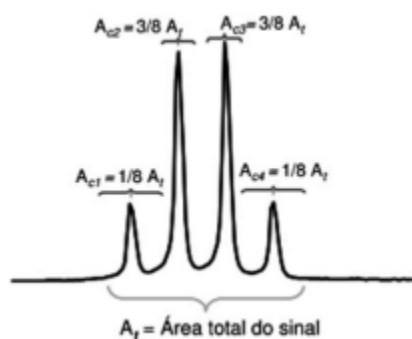


Figura 3-8 Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do $n+1$ (GARCIA, 2006).

O pico de ressonância dos átomos de hidrogênio do CH₂ 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 3-9.



Em que:

Ac1 = área do componente 1;

Ac2 = área do componente 2;

Ac3 = área do componente 3;

Ac4 = área do componente 4;

Figura 3-9 Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio do CH₂ 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 etanólise de óleos vegetais, segundo a Equação 9.

$$\%EE = \left[\frac{(A_{C4} \times 8)}{A_{dd+ee}} \right] \times 100 \quad (9)$$

Em que:

Ac₄ = Área do componente c₄;

Add+ee= Área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05ppm;

%EE = Porcentagem de ésteres etílicos de óleos vegetais.

A Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de transesterificação empregando catalisador homogêneo químico pode ser visualizada na Figura 3-

Figura 3-10 Esquema reacional de síntese do biodiesel.



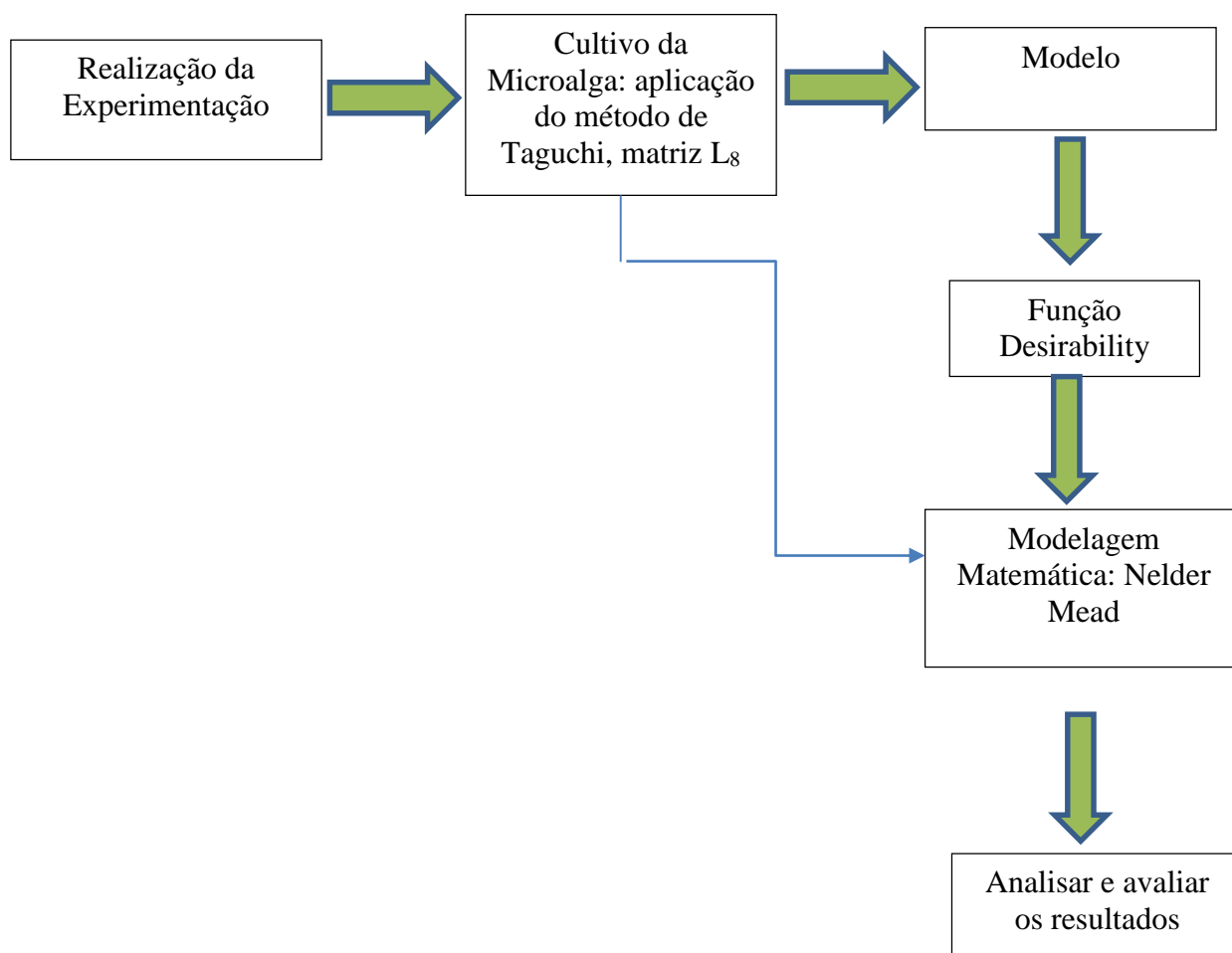
Fonte: Próprio Autor

A reação foi conduzida em reator esférico (20 mL). O catalisador utilizado no foi o H_2SO_4 na quantidade de 10% em massa em relação à massa de material graxo utilizado no experimento. O ensaio foi efetuado em condições fixas de temperatura a 60°C e a razão molar álcool: extrato lipídico, 30:1 de etanol. A reação de síntese do biodiesel ocorreu em um banho de ultrassom. A pressão dentro do vaso reacional correspondeu à pressão de vapor do componente mais volátil presente no meio, o etanol. O sistema foi mantido sob aquecimento por um período máximo de 6 h.

3.2 Métodos Matemáticos

O fluxograma da Figura 3- apresenta a sequência detalhada das Ferramentas Matemáticas envolvidas no processo em estudo. Fases da execução do planejamento de experimentos. Os experimentos de cultivo da microalga foram realizados aplicando o método de Taguchi, matriz L_8 , conforme tabela 3-3 de forma aleatória. Após análise dos dados estatísticos da matriz L_8 , modelos matemáticos foram gerados. Após a identificação dos fatores mais influentes foi utilizada a Função Desirability a fim de obter um melhor ajuste das repostas conjuntas. Foi aplicada uma Modelagem Matemática, após resultados obtidos via método de Taguchi, usando o método Nelder Mead para prever a condição adequada de produção de biomassa e lipídio matematicamente.

Figura 3-11 Fluxograma das fases de execução do planejamento de experimentos no meio de cultivo da *C. minutíssima*



3.3 Planejamento de experimentos (DOE)

3.3.1 O método de Taguchi (arranjo ortogonal L8)

Com objetivo de chegar a influência dos fatores nas respostas concentração celular e teor lipídico (variáveis dependentes), utilizou-se uma matriz L8 de Taguchi para o planejamento experimental exploratório. As variáveis independentes (fatores) propostas para esta etapa foram: CO₂, NO₃⁻, PO₄⁻², Suplementação, temperatura e salinidade.

As tabelas 3-2 e 3-3 apresentam as variáveis e seus parâmetros com os respectivos níveis selecionados e o arranjo ortogonal da matriz L8 de Taguchi respectivamente, utilizadas no cultivo da microalga *C. minutissima*. Para as análises estatísticas foram utilizados os *softwares* Statistica 11.0 e Minitab® 16.

Parâmetros de controle e níveis usados para seleção das variáveis significativas no cultivo da Tabela 3- 2 microalga *C. minutissima*, utilizando a matriz L8 de Taguchi

Códigos	Fatores	Nível Baixo (-)	Nível Alto (+)
A	CO ₂ (%)	0	2
B	NO ₃ ⁻ (g/L)	0,25	0,50
C	PO ₄ ⁻³ (g/L)	0,35	0,65
D	Suplementação (ml)	1	2
E	Temperatura(°C)	20	30
F	Salinidade(g/L)	15	30

Suplementação: metais + vitaminas (ml)

Tabela 3- 3 Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L₈

Experimento	CO ₂	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻²	Suplementação	Temperatura	Salinidade
1	2	2	1	2	1	1
2	2	2	1	1	2	2
3	2	1	2	2	1	2
4	2	1	2	1	2	1
5	1	2	2	2	2	1
6	1	2	2	1	1	2
7	1	1	1	2	2	2
8	1	1	1	1	1	1

3.3.2 Função “*desirability*”

Após Identificação das variáveis independentes mais significativas nas respostas concentração celular e teor de lipídios (variáveis dependentes) por meio do planejamento experimental da matriz L_8 de Taguchi, foi utilizada a **Função “*desirability*”** para a determinação das melhores condições de ajustes de processo, tornando possível a otimização simultânea de múltiplas respostas. Com isso, as melhores condições das respostas são obtidas simultaneamente minimizando, maximizando ou buscando valores nominais de especificações, dependendo da situação mais conveniente para o processo (WANG; WAN, 2009). Ao utilizar a formulação unilateral ou bilateral de Harrington (1965) e Derringer e Suich (1980) apresentada pela Equação $D = (d1(Y1). d2(Y2) . K. du (Yu))^{1/u}$ 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).

Para a realização das análises estatísticas e método de otimização, foram utilizados os softwares Statistica 11.0 e Minitab[®] 16, sendo o minitab o responsável pela otimização utilizando o método *Desirability*.

3.4 Modelagem e simulação

A modelagem matemática do comportamento de microrganismos é reconhecidamente uma tarefa desafiadora. Conforme o potencial de aplicações comerciais de culturas de microalgas aumenta, cresce também a importância de uma modelagem cinética adequada do crescimento e acúmulo de produtos. Trata-se de uma ferramenta importante, por permitir um melhor conhecimento dos fenômenos biológicos, hidrodinâmica, termodinâmica e as interações entre estas áreas (VASTEMAN; ROOMAN; BOGAERTS, 2009).

Estudos cinéticos foram realizados para descrever o crescimento celular e a produção de lipídeos da microalga marinha *Chlorella minutissima* fazendo o uso de equações logísticas a fim de obter informações de forma eficiente e prever condição adequada de produção de biomassa e lipídio matematicamente.

A partir dos dados experimentais obtidos nas diferentes condições de cultivo conforme matriz L8 de Taguchi, foi possível realizar a estimativa dos parâmetros cinéticos de crescimento da microalga *C. minutissima* em fotobiorreator tubular do tipo coluna de bolhas pelo método de Marquardt.

3.4.1 Modelo logístico

Representa a fase exponencial de crescimento e a queda até zero de μ , é um modelo que independe da concentração de substrato (SURENDHIRAN et al., 2015; XU; BOEING, 2014; JALALIZADEH, 2012; YANG et al., 2011; JESUS; FILHO, 2010; LI; WANG, 2010).

$$\mu = \mu_{max}X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (10)$$

Onde X_{max} é a concentração máxima de células no meio de cultivo. Surendhiran et al. (2015) empregaram o modelo logístico para representar a cinética de crescimento das microalgas *Chlorella salina* e *Nannochloropsis oculata* utilizando a equação 10.

3.4.1.1 Cinética de crescimento

Com a finalidade de verificar a influência dos parâmetros de processo sobre o crescimento da microalga, foi considerada a cinética de crescimento logístico descrita Equação 11.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (11)$$

Na Equação 10 X é a concentração de microalgas (g/L) no interior do fotobiorreator no instante de tempo t (dias), μ_{max} é a velocidade máxima de crescimento e X_{max} é a concentração máxima de microalgas possível de ser atingida no fotobiorreator.

O modelo logístico pode ser representado em sua forma integrada como mostrado na Equação 12:

$$X = \frac{X_0 e^{\mu_{max}t}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}}(1 - e^{\mu_{max}t})} \quad (12)$$

Na Equação 12, X_0 é a concentração inicial de microalgas no interior do reator (g/L) e t é o tempo de cultivo.

No processo de produção de biodiesel de microalgas, ambos os parâmetros cinéticos, μ_{max} e X_{max} devem ser maximizados uma vez que a produtividade em células, e por

consequência em biodiesel de microalgas, é proporcional à velocidade de crescimento celular.

A estimativa dos parâmetros cinéticos foi realizada utilizando-se o método de Marquardt, disponível na função *lsqrsolve* do software *Scilab* pela minimização dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais e os estimados pelo modelo. A significância estatística dos parâmetros, para o nível de confiança de 95%, foi verificada utilizando-se o teste “*t*” de *Students* e a validação estatística do modelo, também para o nível de confiança de 95%, foi feita utilizando-se o teste “*F*” de Fischer. Na avaliação do modelo foram considerados o gráfico de ajuste e a distribuição dos resíduos.

3.4.1.2 Cinética de produção de lipídeos

Um modelo não estruturado típico, amplamente utilizado para representar a cinética de formação de produtos é o modelo Leudeking-Piret (1959), como mostrado na equação 13:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (13)$$

Os parâmetros α e β indicam se a produção é associada ($\alpha \neq 0$ e $\beta = 0$), não associada ($\alpha = 0$ e $\beta \neq 0$) ou parcialmente associada ($\alpha \neq 0$ e $\beta \neq 0$) ao crescimento.

3.4.1.3 Produtividade em células

A produtividade em células pode ser obtida pela seguinte relação:

$$P_X = \frac{(X - X_0)}{t} \quad (14)$$

Na Equação 14, observa-se que a otimização da produtividade de células pode ser feita por meio da obtenção da maior concentração de células no menor tempo possível, o que pode ser feito maximizando-se os valores de μ_{max} e X_{max} .

3.4.1.4 Produtividade em lipídeos

A produtividade em lipídeos (P) é obtida por meio do produto entre a concentração de células e o teor de lipídeos (em razão mássica) nas células (T), como mostrado na Equação (15).

$$P_L = \frac{P-P_0}{t} = \frac{TX-P_0}{t} \quad (15)$$

A Equação 15 indica que a melhoria da produtividade pode ser obtida aumentando-se o produto entre o teor de lipídeos, que depende das condições do meio, e a concentração de células, tudo isso no menor tempo possível. Nesse caso, a produtividade em lipídeos dependerá tanto das condições de cultivo que aumentem o teor de lipídeos quanto as que aumentem a produção de células, que podem estar ou não diretamente associadas.

Neste trabalho, o teor de lipídeos foi medido após 7 dias de cultivo. Logo, serão consideradas como variáveis de resposta a serem maximizadas μ_{max} , X_{max} , $T7$ (teor de lipídeos após 7 dias), $X7$ (concentração de células em 7 dias).

3.4.1.5 Melhores valores para os parâmetros de processo

A investigação dos melhores parâmetros de processo para o cultivo de microalgas foi realizada por meio da análise da variância (*ANOVA*), para avaliar a significância de cada parâmetro de processo ou efeito, e pela análise do gráfico de efeitos principais, para avaliar o comportamento das variáveis de resposta em função da variação desses efeitos.

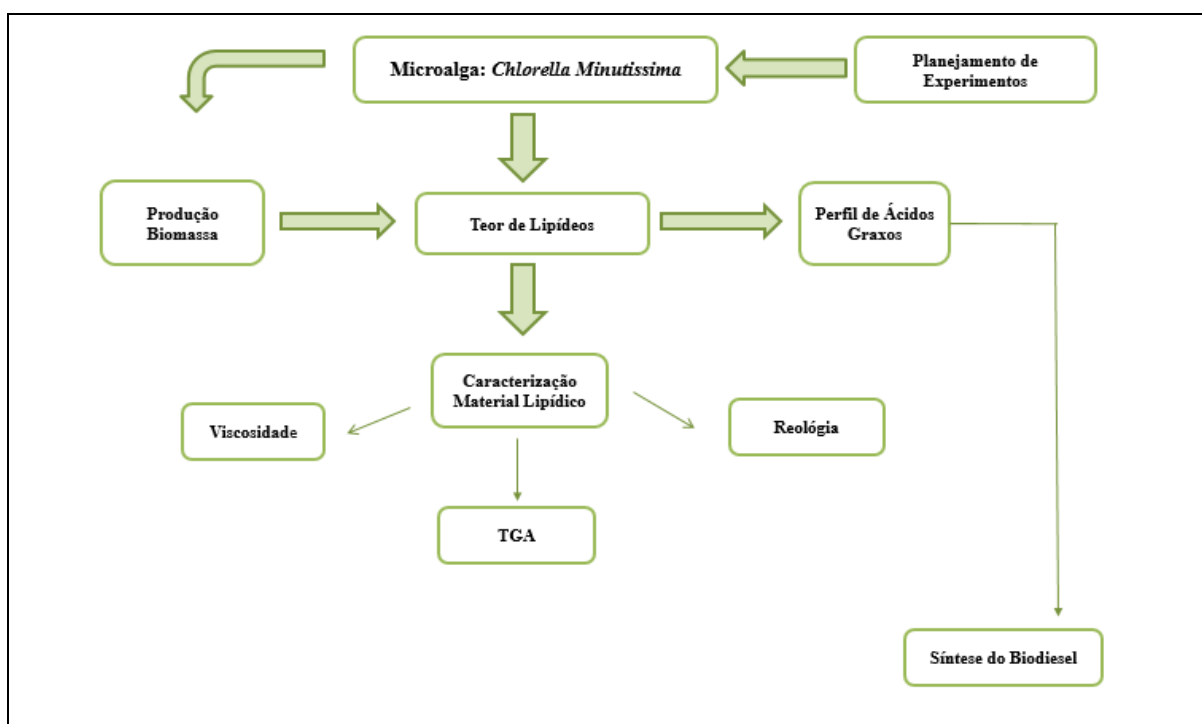
3.4.2 Método de Nelder Mead simplex

O método de busca utilizado para encontrar os melhores valores da Produtividade máxima em células para cada experimento da matriz L_8 de Taguchi, foi o método de Nelder Mead Simplex, utilizando o *software* científico *open-source* Scilab.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. Os experimentos foram realizados de acordo com o esquema da **Figura 4-1**.

Figura 4-1 Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho experimental



Fonte: Próprio Autor

Para avaliar a concentração celular (biomassa) obtida da microalga, bem como o teor de lipídeo, os cultivos foram realizados conforme planejamento de experimentos. As condições de operação foram baseadas em pesquisas bibliográficas. Foi montado um sistema para estudar os fatores de interesse em 2 níveis. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Utilizando os parâmetros para o cultivo apresentados na tabela 3-2 realizando os experimentos nas condições definidas pelo o arranjo ortogonal de Taguchi, pode-se então construir a tabela 4-1 onde se observam os resultados obtidos tanto para a Concentração celular (g/L) de biomassa microalgal quanto para o Teor de lipídeos (%). Os fatores avaliados na matriz ortogonal de Taguchi em dois níveis de operação foram descritos da seguinte maneira: A – Vazão de CO₂, B – Concentração de NO₃⁻, C – Concentração de PO₄⁻³, D – suplementação, E – Temperatura e F – Salinidade.

Tabela 4- 1 Resultados obtidos para concentração celular (Biomassa) e teor de lipídios

Experimento	Fatores codificados						Média Biomassa (g/L)		Média (%) lipídeos	
	A	B	C	D	E	F	Reator 18L	Reator 44L	Reator 18L	Reator 44L
1	2	2	1	2	1	1	0,345	0,322	28,64	31,34
2	2	2	1	1	2	2	0,245	0,193	32,64	37,08
3	2	1	2	2	1	2	0,185	0,219	30,77	30,85
4	2	1	2	1	2	1	0,200	0,216	32,13	29,19
5	1	2	2	2	2	1	0,222	0,193	27,57	34,01
6	1	2	2	1	1	2	0,377	0,324	31,47	30,37
7	1	1	1	2	2	2	0,293	0,273	27,14	23,37
8	1	1	1	1	1	1	0,295	0,305	31,32	34,26

Verifica-se na tabela 4.-1 que o teor de lipídeo obtido ao final de 7 dias de cultivo variou entre $27,57 \pm 1,10$ a $37,08 \pm 1,50$ % entre os dois tamanhos de reatores estudados, pode-se observar também uma pequena variação no teor de lipídeos em ambos os

fotobiorreatores, isso justifica-se pela possível falta de ajuste no sistema operacional bem como algum ruído. O teor mais elevado de lipídeo ($37,08 \pm 1,50 \%$) foi obtido quando se empregou a concentração mais alta de NaNO_3 (50 g L^{-1}) e quando o meio foi suplementado com 2% de CO_2 (experimento 2) e a temperatura mantida a 30°C . Por outro lado, o menor teor de lipídeo ($28,40 \pm 1,10 \%$) foi obtido quando se empregou a mesma concentração de NaNO_3 , porém o meio não foi enriquecido com CO_2 (ensaio 5) temperatura de 30°C . Enquanto que a concentração celular foi mais acentuada, quando foi utilizada a concentração de NaNO_3 (50 g L^{-1}) sem CO_2 e temperatura de 20°C (ensaio 6).

Alguns autores sugerem que resultados altamente satisfatórios tanto de produtividade celular quanto teor de lipídeos podem ser alcançados quando o meio de cultivo é enriquecido com CO_2 devido a alta capacidade de fixação desse gás de combustão pelas microalgas, visto que se trata de uma característica comum desses microrganismos fotossintéticos (Yoo et al.; 2010).

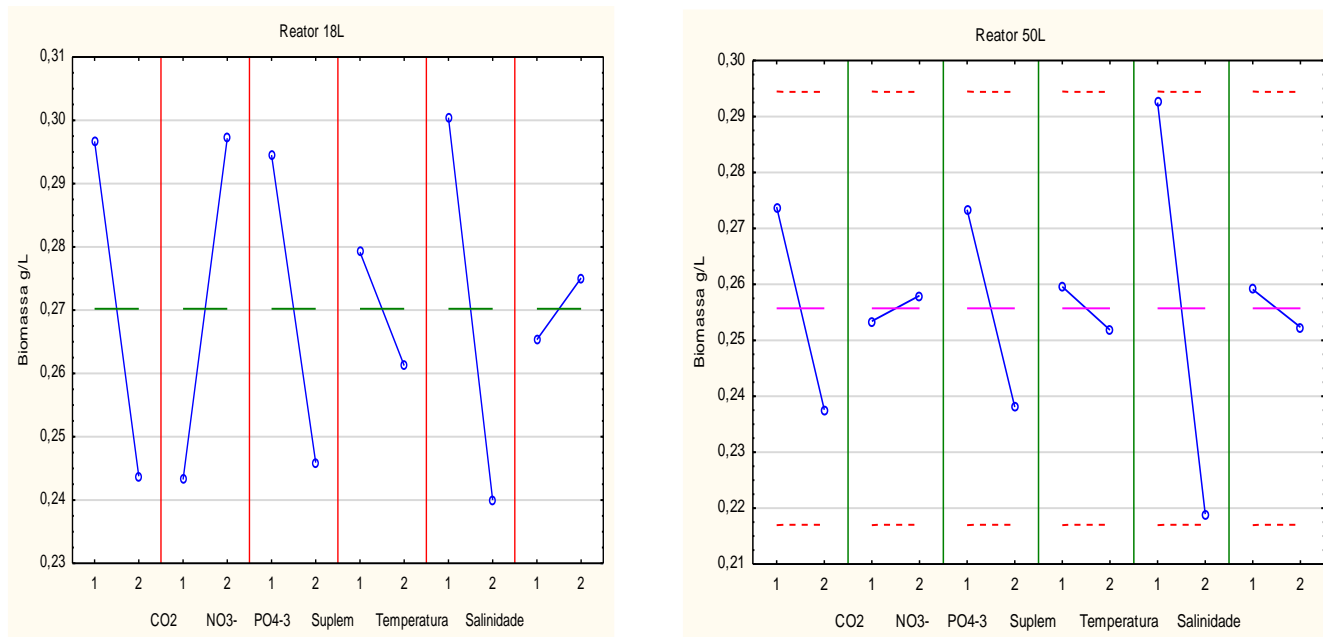
De acordo com a literatura, a limitação de nitrogênio no meio de cultivo pode gerar um estresse fisiológico que altera o metabolismo das microalgas direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídeos de reserva visando preparar a célula para o período de privação (Meng et al., 2009).

4.1 Variável Resposta concentração celular (Biomassa)

4.1.1 Comportamento da concentração celular (g/l) em relação à Média

Com os resultados da tabela 4-1 e o auxílio do software estatístico Statistica 11.0 foi possível elaborar a Figura 4-2 que representa os efeitos de cada fator em relação a variável resposta concentração celular (Biomassa) para os reatores de 18 e 44L respectivamente, na qual quanto maior valor de concentração celular melhor para o processo.

Figura 4-2 Efeito dos fatores sobre a média da variável resposta concentração celular (Biomassa)



Na Figura 4-2 são apresentados os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta, sendo esta análise em relação aos valores médios, onde pode ser observada uma diferença de amplitude entre os níveis dos fatores CO_2 , NO_3^- , PO_4^{3-} e Temperatura em relação aos demais fatores para o reator de 18 L. No reator de 44 L o fator temperatura apresentou uma maior diferença de amplitude em relação aos demais fatores. Pode-se perceber ainda que os fatores CO_2 e PO_4^{3-} em relação aos fatores, NO_3^- , suplementação e salinidade), apresentaram-se com maior influência no processo, lembrando que quanto maior a amplitude entre a reta formada pela média da variável

resposta no nível baixo até o nível alto em relação à reta central (reta média), maior será o efeito dos fatores sobre a variável resposta. A diferença da amplitude dos fatores nos reatores (18 e 44L), pode estar relacionada com a falta de ajustes no processo operacional de ampliação de escala

Porém, para se realizar a análise de quais fatores realmente exercem alguma influência no processo de produção de biomassa, ou seja, que realmente tenha significância estatisticamente comprovada, foi utilizado à ANOVA (Análise de Variância), sendo o grau de confiança da influência de cada fator determinado por meio do teste F. A análise dos resultados obtidos está apresentada na tabela 4-2 e 4-3 para os reatores de 18 e 44L. As Figuras 1,2,3 e 4 do apêndice B apresentam os valores de $T_{calculado}$ e $P_{crítico}$ para todos os fatores envolvidos, bem como os coeficientes para o modelo linear para a concentração de biomassa bem como para o teor lipídeos em relação à média. Para isso, foi utilizando o software Statistica 11.0 onde foi possível construir o modelo linear para as variáveis respostas, concentração de biomassa e teor lipídeos. Para avaliar a significância dos coeficientes do modelo foi realizado um teste de significância para um nível de confiança 95%, sendo influentes aqueles com $P < 0,05$, conforme apêndice B.

Tabela 4- 2 Análise da variância para Biomassa em relação à média Reator 18 L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO₂	0,016801	1	0,016801	8,95876	0,008174
NO₃⁻	0,017442	1	0,017442	9,30056	0,007244
PO₄⁻³	0,014162	1	0,014162	7,55158	0,013725
Suplementação	0,001926	1	0,001926	1,02702	0,325068
Temperatura	0,021901	1	0,021901	11,67822	0,003282
Salinidade	0,000570	1	0,000570	0,30414	0,588475
Erro	0,031881	17	0,001875		

Modelo Biomassa 18L = $0,2702 + 0,026458 \text{ CO}_2 - 0,026958 \text{ NO}_3^{-1} + 0,024292 \text{ PO}_4^{+1} + 0,008958 \text{ Suplementação} + 0,030208 \text{ Temperatura} - 0,004875 \text{ Salinidade}$

Tabela 4- 3 Análise da variância para Biomassa em relação à média Reator 44L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	0,007884	1	0,007884	5,24917	0,035003
NO ₃ ⁻	0,000126	1	0,000126	0,08391	0,04564
PO ₄ ⁻³	0,007455	1	0,007455	4,96356	0,039681
Suplementação	0,000360	1	0,000360	0,23993	0,630520
Temperatura	0,032487	1	0,032487	21,62887	0,000229
Salinidade	0,000273	1	0,000273	0,18200	0,675010
Erro	0,025534	17	0,001502		

Modelo Biomassa 44L = 0,255708 + 0,018125 CO₂ - 0,002292 NO₃⁻¹ + 0,017625 PO₄⁺¹ + 0,003875 Suplementação + 0,036792 Temperatura + 0,003375 Salinidade

Por meio do teste F pode-se afirmar com 95% de confiança que os fatores: Temperatura, concentração de NO₃⁻, vazão de CO₂ e PO₄⁻³ exercem grande influência sobre a variável resposta concentração celular nos fotobiorreatores de 18L. No reator de 44L as mesmas variáveis exercem influência sobre a variável resposta, ressaltando que, quando os fatores apresentam valores de *p-value* muito próximo do desejado ($p \leq 0,05$) para o dado nível de significância, são considerados como sendo fatores significantes.

Pela análise da ANOVA os fatores que se demonstram significantes para o crescimento celular (concentração biomassa) foram os fatores, Temperatura, concentração de NO₃⁻, vazão de CO₂ e concentração de PO₄⁻³. Diversos autores reportaram que estes fatores são de suma importância no meio de cultivo. Desse modo, as afirmações anteriormente descritas vão de encontro aos resultados observados para o crescimento celular, que indicaram que o nível baixo para o PO₄⁻³ favoreceu o crescimento celular pois o fósforo associa-se a troca energética, na formação de ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas, sendo encontrado principalmente como ortofosfato (HPO₄³⁻) na água do mar. A temperatura empregada no cultivo tem um grande efeito sobre a produtividade da biomassa (RENAUD et al., 2002; VERMA et al., 2010), neste caso o crescimento celular foi favorecido pela temperatura operando em nível baixo.

O processo de fotossíntese é significativamente relacionado com a concentração de CO_2 no meio de cultivo (RYU; OH; KIM, 2009) e cada espécie responde distintamente para diversas concentrações de CO_2 (MORAIS; COSTA, 2007). De acordo com a análise dos resultados para o crescimento celular baseado nos experimentos realizados, o nível baixo para a vazão de CO_2 favoreceu o crescimento celular para esta espécie de microalga em estudo.

Conforme Lourenço (2006), 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. A análise dos resultados para o crescimento celular baseado nos experimentos realizados apontou que o nível alto para a concentrações de NO_3 favoreceu o crescimento celular.

Os resultados foram analisados também em relação ao S/N . Como a variável resposta desejada é uma maior concentração celular (biomassa), logo, a equação proposta por Taguchi para o cálculo da relação S/N a ser utilizada foi a de acordo com a relação "Maior é melhor" (Ross, 1996). Os resultados dos efeitos sobre a relação S/N são mostrados na figura 4-3, sendo ainda a análise de variância realizada para os efeitos de S/N mostrada pelas tabelas 4-3 e 4-4.

Figura 4-3 Comportamento da concentração celular em relação à razão S/N

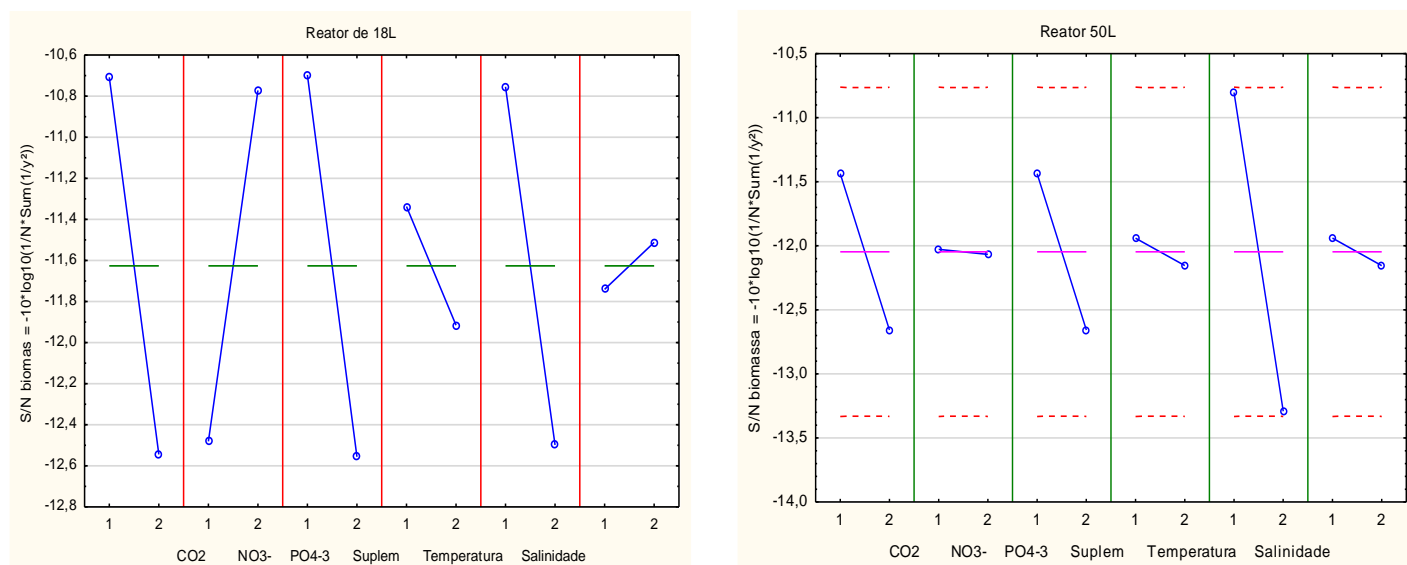


Tabela 4- 4 Análise da variância para Biomassa em relação ao S/N Reator 18L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	20,21173	1	20,21173	11,43558	0,003546
NO ₃ ⁻	17,50950	1	17,50950	9,90669	0,005875
PO ₄ ⁻³	20,72860	1	20,72860	11,72802	0,003231
Suplementação	2,00714	1	2,00714	1,13562	0,301482
Temperatura	18,23166	1	18,23166	10,31528	0,005117
Salinidade	0,31282	1	0,31282	0,17699	0,679245
Erro	30,04653	17	1,76744		

Tabela 4- 5 Análise da variância para Biomassa em relação ao S/N Reator 44L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	8,93863	1	8,93863	5,40601	0,032705
NO ₃ ⁻	0,00963	1	0,00963	0,00583	0,940048
PO ₄ ⁻³	8,93984	1	8,93984	5,40674	0,032694
Suplementação	0,27131	1	0,27131	0,16408	0,690476
Temperatura	37,13652	1	37,13652	22,45988	0,000190
Salinidade	0,27593	1	0,27593	0,16688	0,687997
Erro	28,10883	17	1,65346		

Comparando os efeitos dos fatores em relação à média (Figura 4-2) com os efeitos dos fatores em relação ao S/N (figura 4-3) e Tabelas (4-2, 4-3, 4-4, 4-5), pode-se observar que os resultados foram semelhantes, mostrando que para ambas as análises devem-se utilizar os parâmetros NO₃⁻ no nível alto, Temperatura, CO₂ e PO₄⁻³ são necessários serem utilizados no nível baixo para alcançar maiores valores de concentração celular.

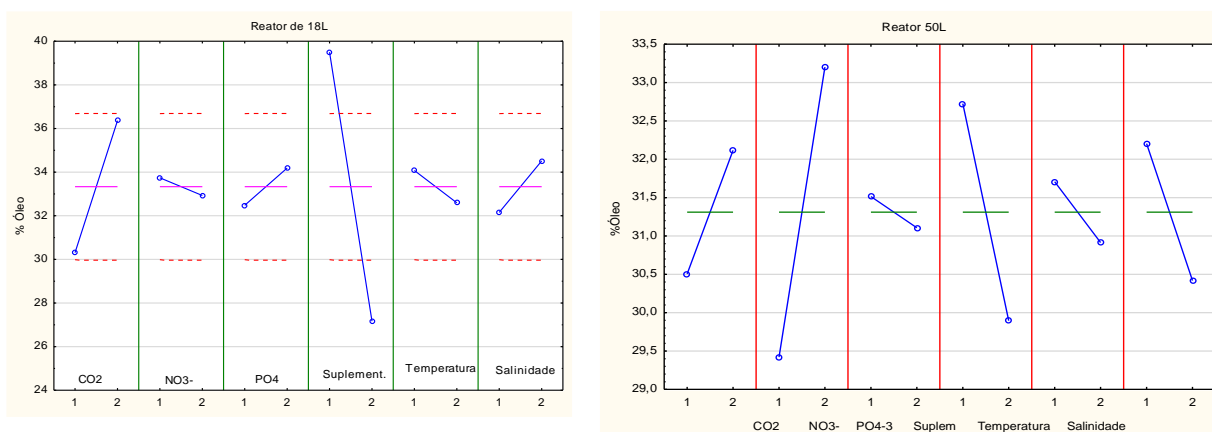
A diferença entre a comparação entre as duas análises fica em relação à concentração de nitrato presente nos dois tamanhos de fotobiorreatores, que para a análise comparativa, aparece como resultado significativo para os resultados em relação à média e a relação razão S/N para o fotobiorreator de 18 L, não figurando como fator significativo em relação ao fotobiorreator de 44 L, podendo ser justificada por falta de ajuste no sistema operacional.

4.2 Variável Resposta Teor de Lipídeos (%)

4.2.1 Comportamento do Teor de lipídeos em relação à Média

Com os resultados da tabela 4-1 e o auxílio do software estatístico Statistica 11.0 foi possível elaborar a Figura 4-4 que representa os efeitos de cada fator em relação a variável resposta teor de lipídeos (% óleo) para os reatores de 18 e 44L, na qual quanto maior valor do percentual de óleo melhor para o processo.

Figura 4-4 Efeito dos fatores sobre a média da variável resposta Teor de lipídeos (% Óleo)



Na figura 4-4 são apresentados os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta, sendo esta análise em relação aos valores médios, onde pode ser observada uma maior amplitude para o fator suplementação (concentração de Metais e vitaminas) no nível baixo, seguido pelo CO₂ operando no nível alto quando comparados aos demais fatores para os fotobiorreatores de 18 L. Já para os fotobiorreatores de 44 L, foi observado uma maior amplitude para o fator concentração de NO₃⁻ operando em nível alto seguida pelo fator suplementação (concentração de Metais e vitaminas) operando no nível baixo, CO₂ operando no nível alto, temperatura no nível baixo. Pode se observar que na análise dos fatores para os dois volumes de reatores houve uma divergência entre alguns fatores tais como: NO₃⁻, PO₄⁻³ e salinidade, podendo ser justificado pela falta de ajuste operacional na experimentação bem como alguma influência de fatores externos não controláveis (não identificada) no momento da experimentação. Estes resultados podem ser confirmados pela análise da Anova (Análise de Variância) mostrados pelas tabelas 4-5 e 4-6 para os

Fotobiorreatores de 18L e 44 L, sendo o grau de confiança da influência de cada fator determinado por meio do teste F.

Tabela 4- 6 Análise da variância para % Óleo em relação à média reator de 18 L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	16,69945	1	16,69945	20,47587	0,000299
NO ₃ ⁻	0,40358	1	0,40358	0,49484	0,491298
PO ₄ ⁻³	1,81882	1	1,81882	2,23012	0,153671
Suplementação	67,78895	1	67,78895	83,11877	0,000000
Temperatura	2,77532	1	2,77532	3,40293	0,032577
Salinidade	2,12517	1	2,12517	2,60575	0,124883
Erro	13,86464	17	0,81557		

Modelo Lipídeos 18L = 33,3350 - 3,0250 CO₂ + 0,4058 NO₃⁻¹ -0,8542 PO₄⁺¹ +6,1675 Suplementação + 0,7408 Temperatura -1,1800 Salinidade

Tabela 4- 7 Análise da variância para % Óleo em relação à média reator de 44L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	15,5848	1	15,58482	1,061513	0,317307
NO ₃ ⁻	85,7304	1	85,73040	5,839270	0,027205
PO ₄ ⁻³	0,9923	1	0,99227	0,067585	0,798008
Suplementação	48,0534	1	48,05340	3,273013	0,088147
Temperatura	3,7763	1	3,77627	0,257209	0,618560
Salinidade	19,1174	1	19,11735	1,302121	0,269647
Erro	249,5889	17	14,68170		

Modelo Lipídeos 44L = 31,3108 -0,8058 CO₂ -1,8900 NO₃⁻¹ + 0,2033 PO₄⁺¹ +1,4150 Suplementação + 0,3967 Temperatura + 0,8925 Salinidade

Por meio do teste F pode-se afirmar com 95% de confiança que os fatores: Temperatura, concentração de NO₃⁻, vazão de CO₂ e suplementação influência sobre a variável resposta teor de

lipídeos. As divergências já mencionadas na análise dos gráficos dos efeitos são confirmadas pela análise da Anova.

Segundo Praveenkumar e colaboradores (2012), estes fatores são importantes no acúmulo de lipídeos pela célula. Desse modo, as afirmações anteriormente descritas vão de encontro aos resultados observados para a produção de lipídeos, que indicaram que o nível baixo para a temperatura e suplementação, nível alto para CO_2 e NO_3^- favoreceram o acúmulo de óleo. Geralmente a temperatura empregada no cultivo influencia e a composição de ácidos graxos dos micro-organismos. Existe uma tendência geral para instauração dos ácidos graxos com a diminuição da temperatura e formação de ácidos graxos saturados com o aumento da temperatura. Esse evento tem sido observado para muitas espécies. Em alguns casos observou-se também que o teor de lipídeos aumenta com o aumento da temperatura. Por outro lado, em algumas espécies crescidas sob diferentes condições de temperatura, nenhuma mudança significativa foi observada no teor de lipídeos. No entanto, pesquisas sobre o efeito da temperatura no teor de lipídeo produzido pelas células precisam ser mais exploradas (RENAUD et al., 2002; VERMA et al., 2010). Segundo (RITTMANN, 2008) as microalgas acumulam grande quantidade de lipídeos como material de reserva, mas elas fazem isso nas condições de estresse e crescimento lento. As fontes de carbono CO_2 podem ser utilizados por microalgas para induzir a produção de lipídeos. Os componentes e conteúdo de lipídeos nas células de microalgas podem variar de espécie para espécie (HUANG et al., 2010). Em suma, os fatores químicos (nutrientes, salinidade) e físicos (temperatura), a fase de crescimento e a forma de cultivo afetam a quantidade de triacilglicerídeos (TAG) e a composição de ácidos graxos (HU et al., 2008; DUNSTAN et al., 1993). Segundo CONVERTI et al., (2009) a temperatura e a concentração de nitrogênio influenciam o teor de lipídeos, que em condições de estresse reduz a crescimento celular. Para produzir lipídios a célula exige o dobro de nutrientes que precisa para a síntese de carboidratos e proteínas, assim a deficiência de fosfato pode limitar o acúmulo de lipídio (HU et al., 2008). O comportamento do Teor de lipídeos em relação à razão S/N pode ser observada na Figura 4-, bem como a análise da variância nas tabelas 4-7 e 4-8.

Figura 4-5 Comportamento do Teor de lipídeos em relação à razão S/N

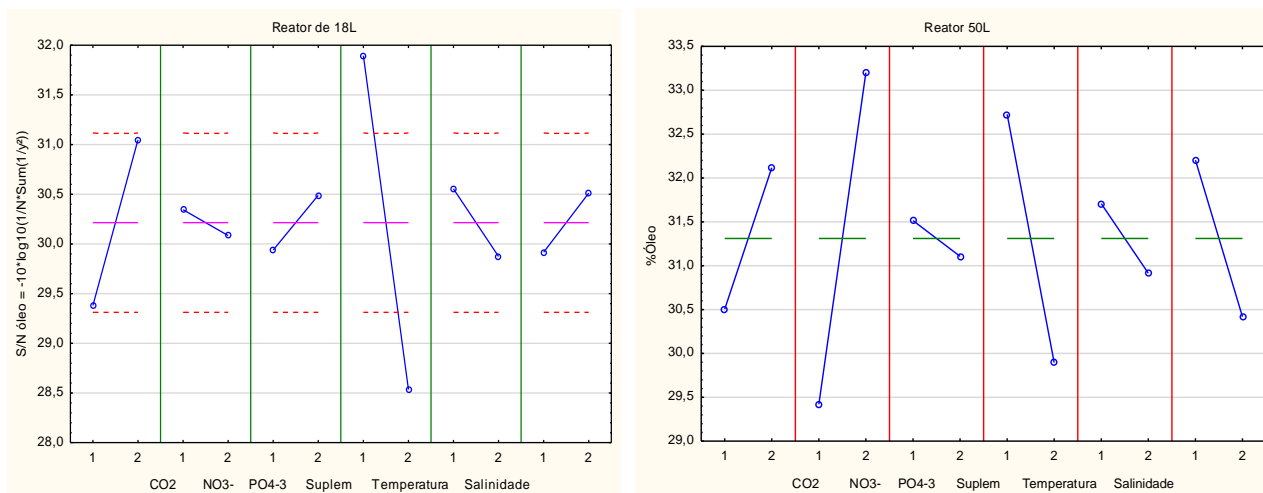


Tabela 4-8 Análise da variância para % Óleo em relação ao S/N Reator 18 L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	16,69945	1	16,69945	20,47587	0,000299
NO ₃ ⁻	0,40358	1	0,40358	0,49484	0,491298
PO ₄ ⁻³	1,81882	1	1,81882	2,23012	0,153671
Suplementação	67,78895	1	67,78895	83,11877	0,000000
Temperatura	2,77532	1	2,77532	3,40293	0,082577
Salinidade	2,12517	1	2,12517	2,60575	0,124883
Erro	13,86464	17	0,81557		

Comparando os efeitos dos fatores em relação à média (figura 4-4) e tabelas (4-8 e 4-9) com os efeitos dos fatores em relação ao S/N (figura 4-5), pode-se observar que os resultados foram semelhantes, mostrando que para ambas as análises devem-se utilizar os parâmetros já discutidos na figura 4.4.

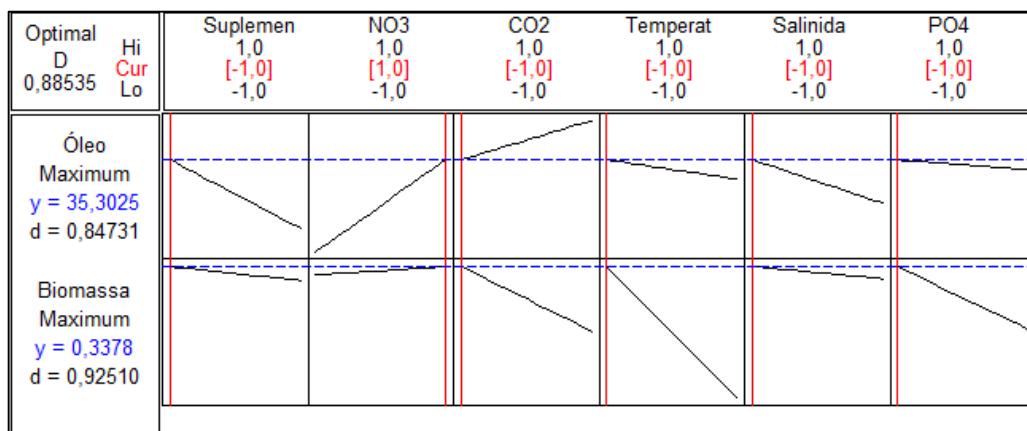
Tabela 4- 9 Análise da variância para % Óleo em relação ao S/N Reator 44L

Fatores	Seq SS	DF	Adj Ms	F	P
CO ₂	1,60902	1	1,609022	1,304197	0,269279
NO ₃ ⁻	7,45693	1	7,456929	6,044234	0,024977
PO ₄ ⁻³	0,00100	1	0,001003	0,000813	0,977589
Suplementação	4,22335	1	4,223348	3,423246	0,081744
Temperatura	0,68937	1	0,689365	0,558767	0,464973
Salinidade	2,11709	1	2,117091	1,716014	0,207633
Erro	20,97334	17	1,233726		

4.3 Otimização com a função *desirability*

Após os resultados obtidos pelo planejamento de experimentos exploratório, matriz L₈ de Taguchi e Com o auxílio do software Minitab 16, foi possível utilizar da função *Desirability* para a análise conjunta dos resultados tanto para a variável resposta concentração celular (biomassa), como para o teor lipídico (% óleo), atribuindo-se valores para os parâmetros *T* (valor desejado ótimo), *L* (menor valor aceitável) e *U* (maior valor aceitável) da função *desirability* referente a maximização. A Otimização simultânea das variáveis respostas: Biomassa e Teor de Lipídeos pode ser observada na Figura 4-.

Figura 4-6 Gráfico para a análise conjunta segundo proposto pelo método *Desirability*



$d_i = 1$: valor desejável;

$0,80 \leq d_i < 1$: valor excelente;

$0,63 \leq d_i < 0,80$: valor está adequado;

$0,40 \leq d_i < 0,63$: valor aceitável, mas pobre;

$0,30 \leq d_i < 0,40$: valor no limite de aceitabilidade;

Na Figura 4- é possível verificar a função *Desirability* conjunta, que atingiu um D global = 088535. Esse valor da função é classificado como sendo

excelente em relação aos valores preditos. Pode-se observar ainda na Figura 4-, os valores em vermelho são os valores preditos pelo método, sendo os valores acima deles os máximos possíveis e os abaixo os mínimos, ou seja, os níveis -1 e 1 do arranjo experimental de Taguchi.

Podemos visualizar os valores dos *Desirabilities* individuais representados pela letra d, na Figura 4-, tanto para Biomassa quanto para % óleo. Os valores de “y” em azul representam os valores de Biomassa e % óleo preditos. A linha *Composite Desirability*, Média Biomassa e Média % óleo, representam respectivamente o comportamento das variáveis respostas com a variação de cada fator.

É possível ainda extrair da Figura 4- os melhores níveis dos fatores para que se alcance o melhor resultado combinado entre as respostas, ou seja, os valores que otimizem o processo. Desse modo, o melhor ajuste previsto para o processo, fornecerá a maior concentração de biomassa aliada ao máximo de acúmulo de lipídeos. Para o processo em questão o método propõe que o ajuste do NO_3^- deve ser efetuado no nível alto, enquanto que os demais fatores devem operar em seu nível baixo.

A partir daí, foi possível construir a fim de comparar os resultados preditos com os resultados reais, a partir do experimento de confirmatório nos reatores de 18 L. A Tabela 4- 9 apresenta os resultados reais (experimentais) comparados aos preditos.

Tabela 4- 10 Comparação dos valores Reais com o Predito

Valores	Biomassa g/l	% óleo
Real	0,3415	35,5041
Predito	0,3378	35,3025

Diante dos resultados apresentados na tabela 4-10, pode-se dizer que a função *desirability* é uma ferramenta matemática adequada para a otimização de variáveis respostas conjunta possibilitando assim, a procura de uma solução viável satisfaça as condições desejadas do processo ou seja, foi possível determinar as condições experimentais nas quais as variáveis estudadas fornecem os valores máximos de concentração celular (Biomassa) e teor de lipídeos (%) dentro da faixa analisada pelo planejamento.

4.4 Cinética de Crescimento

apresenta os resultados da regressão não linear do modelo cinético de crescimento logístico aos dados experimentais, onde estão incluídos: os valores dos parâmetros e seus intervalos de confiança (valores após o símbolo \pm) para o nível de confiabilidade de 95% de acordo com a distribuição “*t*” de *Students*; os valores *p* obtidos por meio da análise da variância (ANOVA) da regressão, sendo considerada a regressão significativa para o nível de confiança de 95%, de acordo com a distribuição F de Fischer, para valores de *p* menores que 0,025; e os coeficientes de correlação da regressão, R^2 e R^2_{max} , os quais fornecem uma ideia da qualidade do ajuste, sendo melhor o ajuste quanto mais próximo for o R^2 do valor de R^2_{max} .

Tabela 4- 11 Resultados da regressão não linear do modelo logístico aos dados experimentais

V_{reator} (L)	Experimento	μ_{max} (dia ⁻¹)	X_{max} (g L ⁻¹)	<i>p</i>	R^2	R^2_{max}
18	1	1,0 ± 0,2	0,33 ± 0,02	9,5x10 ⁻²⁰	0,9499	0,9660
50	1	1,1 ± 0,1	0,31 ± 0,01	1,3x10 ⁻²⁵	0,9809	0,9989
18	2	0,6 ± 0,2	0,23 ± 0,03	2,2x10 ⁻¹⁰	0,9482	0,9785
50	2	0,8 ± 0,2	0,20 ± 0,01	7,7x10 ⁻¹¹	0,9335	0,9722
18	3	0,5 ± 0,1	0,20 ± 0,01	9,1x10 ⁻¹⁸	0,9668	0,9906
50	3	0,4 ± 0,1	0,25 ± 0,02	7,9x10 ⁻²⁰	0,9785	0,9871
18	4	0,7 ± 0,2	0,21 ± 0,01	1,6x10 ⁻¹⁵	0,9827	0,9886
50	4	0,7 ± 0,2	0,22 ± 0,02	7,5x10 ⁻¹⁵	0,9390	0,9841
18	5	0,9 ± 0,1	0,23 ± 0,01	6,2x10 ⁻¹⁸	0,9815	0,9874
50	5	0,7 ± 0,3	0,20 ± 0,02	8,2x10 ⁻¹³	0,9542	0,9824
18	6	0,8 ± 0,2	0,37 ± 0,02	3,6x10 ⁻¹⁵	0,9867	0,9878
50	6	0,7 ± 0,1	0,30 ± 0,02	1,7x10 ⁻¹⁴	0,9644	0,9888
18	7	0,52 ± 0,06	0,30 ± 0,01	3,5x10 ⁻¹⁷	0,9892	0,9974
50	7	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	6,9x10 ⁻¹⁵	0,9379	0,9754
18	8	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3	6,9x10 ⁻¹²	0,9682	0,9936
50	8	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,2x10 ⁻¹⁸	0,9708	0,9784

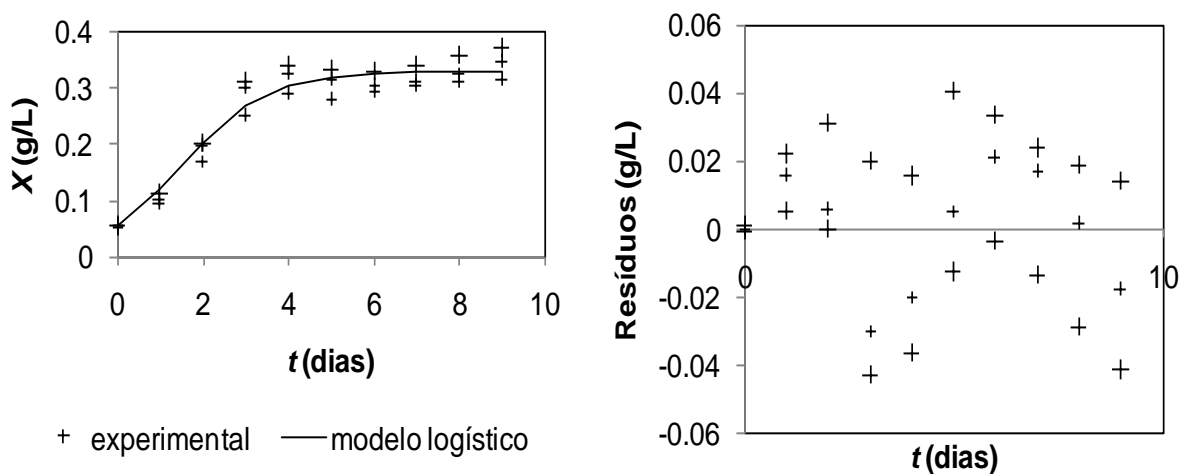
Na tabela 4-11 observa-se que: ambos os parâmetros, μ_{max} e X_{max} são significativos para o nível de confiança de 95%, de acordo com a distribuição “ t ” de Students, uma vez que os valores dos parâmetros são maiores que de seus respectivos desvios-padrão; a regressão foi significativa para todos os experimentos realizados para o nível de confiança de 95%, considerando a distribuição F de Fischer, uma vez que os valores de p obtidos foram menores que 0,025; e os coeficientes de correlação R^2 obtidos são próximos dos valores de R^2_{max} indicando uma boa qualidade de ajuste.

Como mostrado, os valores ajustados para os parâmetros para os reatores de 18 e 44 L foram praticamente idênticos, considerando os respectivos intervalos de confiança, indicando que a diferença nas dimensões dos reatores utilizados pouco influenciou na cinética de crescimento.

Os gráficos de ajuste e de resíduos para os experimentos foram analisados a fim de verificar a qualidade do ajuste. Em termos de qualidade de ajuste, foram verificados os gráficos para todos os experimentos, os quais apresentaram comportamento similar ao do apresentado na 18 litros.

Figura 4-, para o experimento 1, utilizando o fotobiorreator de 18 litros.

Figura 4-7 Gráficos de ajuste e de resíduos obtidos pela regressão não linear do modelo logístico aos dados experimentais para o experimento 1.



A figura 4-7 mostra que o modelo logístico conseguiu representar bem os dados experimentais de crescimento de microalgas no fotobiorreator, com a curva obtida pelo modelo passando próxima aos pontos experimentais e com uma distribuição aleatória de resíduos.

Os parâmetros cinéticos μ_{max} e X_{max} estão diretamente relacionados com a produtividade de lipídeos, uma vez que, quanto maior o valor de μ_{max} mais rápido será o crescimento da microalga, reduzindo o tempo da batelada e aumentando a produtividade em células e, quanto maior for a concentração máxima possível de células no reator, maior será a quantidade de células produzida em cada batelada e, por sua vez, maior a quantidade de células disponíveis para produção de lipídeos. O modelo pode ser obtido usando equação 11 e os coeficientes da tabela 4-11 para o experimento 1 conforme equação 16.

$$\frac{dX}{dt} = 1X \left(1 - \frac{X}{0,33} \right) \quad (16)$$

4.4.1 Efeitos Principais

A avaliação dos efeitos principais sobre as variáveis de resposta foi realizada por meio da análise de gráficos de efeitos principais e do quadro ANOVA.

Os valores de p para a análise da variância dos efeitos sobre as variáveis de resposta são apresentados na tabela 4-12, sendo considerados significantes, no nível de confiança de 95%, os efeitos com valores de p menores ou iguais a 0,05.

Tabela 4- 12 Resultados da análise da variância dos efeitos sobre as variáveis de resposta.

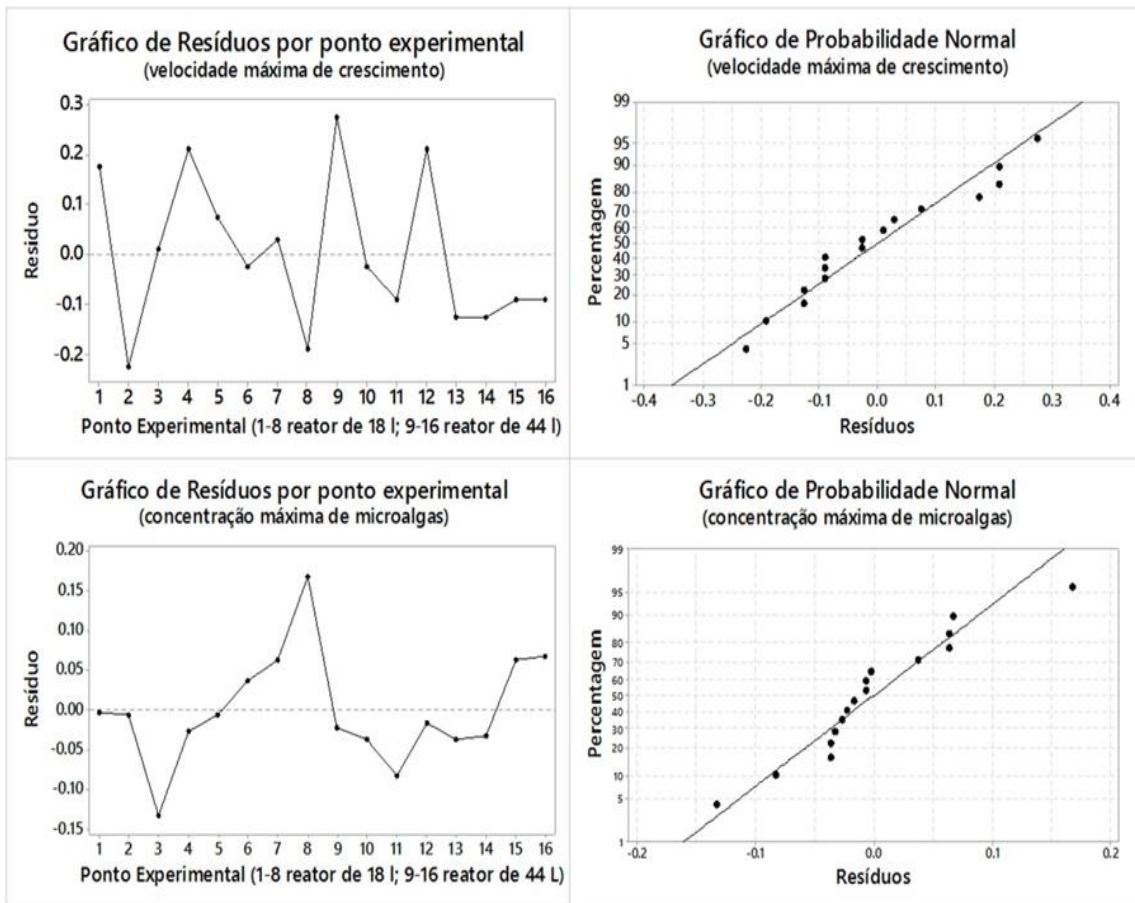
Efeitos	Variáveis de resposta (valores de p)	
	μ_{max}	X_{max}
CO ₂	0,254	0,053
NO ₃ ⁻	0,001	0,556
PO ₄ ⁻	0,772	0,082
Suplementação	0,590	0,381
Temperatura	0,901	0,018
Salinidade	0,254	0,482

Como mostrado na Tabela 4-11, a concentração de nitrato (NO₃⁻) afeta significativamente a constante cinética μ_{max} , uma vez que foi obtido um valor de nível de significância p , menor que 0,05, para o grau de confiança de 95%) e a variável temperatura

afeta significativamente a concentração máxima de microalgas. Dessa forma, para o intervalo experimental considerado, essas variáveis são as que mais afetam a cinética de crescimento das microalgas.

Os gráficos de probabilidade normal para a velocidade máxima de crescimento, μ_{max} , com relação à concentração de nitrato, e da concentração máxima de microalgas, X_{max} , com relação à temperatura estão apresentados na Figura 4.8.

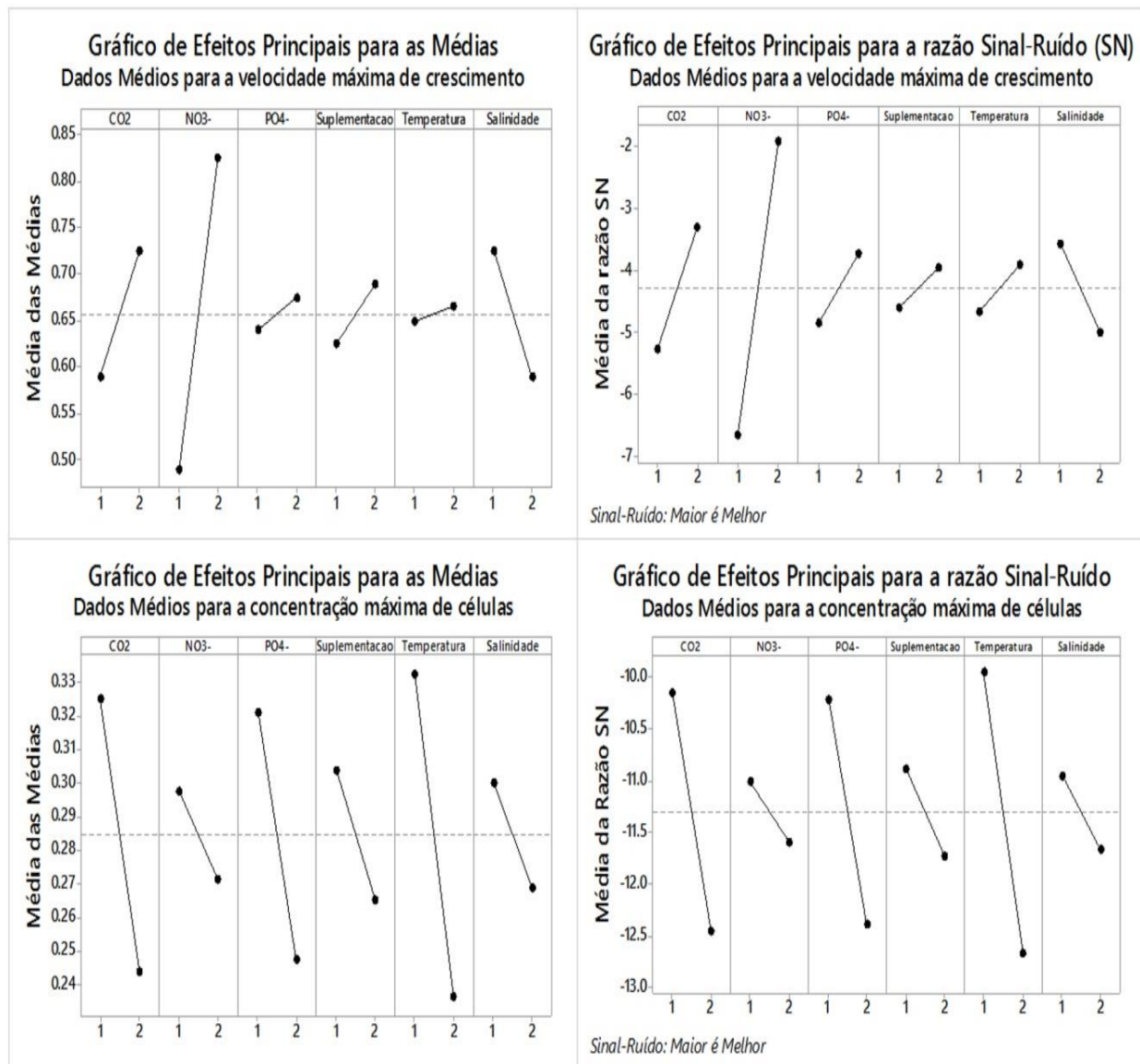
Figura 4-8 Gráficos de probabilidade normal dos resíduos e de distribuição dos resíduos para a velocidade máxima de crescimento em função da concentração de nitrato e para a concentração máxima de microalgas em função da temperatura.



A Figura 4- mostra os resíduos para os parâmetros por ponto experimental, onde os pontos de 1 a 8 correspondem respectivamente aos experimentos 1 a 8 para o reator de 18 litros e os pontos de 9 a 16 correspondem respectivamente aos experimentos de 1 a 8 para o

reator de 50 litros. Observa-se que os resíduos estão próximos da curva de probabilidade normal para ambas as variáveis dependentes, velocidade máxima de crescimento e concentração máxima de células.

Figura 4-9 Gráficos de efeitos principais para as médias e para as razões sinal-ruído (SN) para a velocidade máxima de crescimento e para a concentração máxima de células



A Figura 4- mostra que o valor da velocidade específica máxima de crescimento é maior para a concentração de nitrato (variável significativa) no nível máximo. Apesar de outros parâmetros também influenciarem a velocidade máxima de crescimento, como a

percentagem de CO₂ e a salinidade, verifica-se que essa influência é consideravelmente menor que a da concentração de nitrato e, conforme a ANOVA apresentada na tabela 4-11 pode-se desconsiderar essa influência. Para a concentração máxima de células observa-se que a temperatura é o efeito principal que mais afeta X_{max} , porém, além da temperatura, observa-se que a percentagem de CO₂ e a concentração de fosfato também podem ser considerados como efeitos principais sobre X_{max} , apesar dos resultados da tabela 4-11 (ANOVA) indicarem que esses parâmetros, apesar de possuírem baixos valores de p , não são significativos no nível de confiança de 95%. Portanto, os resultados indicam que a concentração máxima de células é obtida para valores de temperatura, concentração de fosfato e temperatura no nível baixo.

Considerando de forma global os resultados obtidos pela utilização do método de Taguchi para o intervalo experimental realizado, pode-se indicar como melhores condições de cultivo as condições que apresentem a concentração de nitrato no nível alto e todos demais efeitos principais, percentagem de CO₂, concentração de fosfato e temperatura, no nível baixo.

Uma vez que nenhuma das condições experimentais apresentadas no planejamento L8 de Taguchi apresenta essas condições, foi proposta a realização de mais um experimento (experimento 9, reator de 18L), com o nitrato no nível alto e todos os demais parâmetros no nível baixo, sendo obtidos os resultados apresentados na tabela 4-12.

Tabela 4- 13 Resultados obtidos pelo experimento 9, proposto a partir dos resultados obtidos pelo método de Taguchi

Experimento	X_{max} (g L⁻¹)	p	R²	R²_{max}
1	0,33 ± 0,02	9,5x10 ⁻²⁰	0,9499	0,9660
6	0,37 ± 0,02	3,6x10 ⁻¹⁵	0,9867	0,9878
9	0,37 ± 0,05	2,9x10 ⁻¹²	0,9720	0,9911

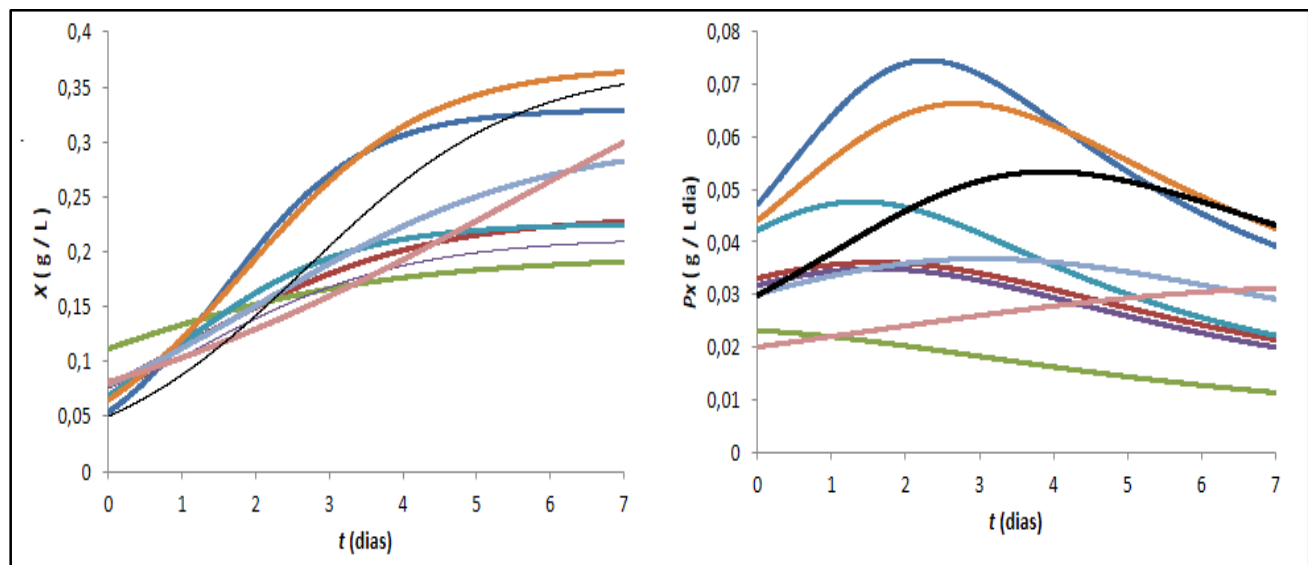
Observa-se que o resultado apresentado na tabela 4-13(experimento 9) é bastante similar aos experimentos 1 e 6 (tabela 4-10) a diferença entre o experimento 1,6 e o experimento 9 está na concentração de fosfato e na salinidade utilizadas, dentre essas, a concentração de

fosfato poderia gerar alguma diferença, porém, por não ser a variável mais significativa no processo, ela não demonstrou nenhum efeito de melhora entre o experimento 6 e o indicado na otimização.

4.4.2 Otimização da produtividade em células

Outro parâmetro avaliado neste foi a produtividade em microalgas, que pode ser simulada pela Equação 15 em função dos modelos cinéticos validados para cada parâmetro. Considerando que os modelos cinéticos obtidos foram praticamente os mesmos para os reatores de 18L e de 44L, o procedimento de otimização da produtividade em células foi realizado considerando os parâmetros cinéticos estimados para o reator de 18L. A figura 4-10 **Error! Reference source not found.** mostra a simulação dos resultados obtidos para a produtividade (P_x) e concentração de microalgas (X) em função do tempo para os experimentos realizados no reator de 18L, desprezando no cálculo da produtividade o tempo $t=0$ (para o qual a produtividade na prática é igual a zero e que na Equação 15 gera uma indeterminação tipo $0/0$).

Figura 4-10 Simulação da concentração de células (X) e da produtividade em células (P_x) em função do tempo para os experimentos realizados no reator de 20 L.



Pode-se observar que os experimentos 1, 6 e 9 foram capazes de obter maiores concentrações de células e maiores valores de produtividade em células, parâmetros que são diretamente proporcionais à produtividade em lipídeos.

A produtividade máxima em células (P_{max}) foi estimada, utilizando o método Nelder- Mead Simplex, em função do tempo de colheita ótimo ($t = t_{ot}$), para o qual a concentração de microalgas é $X = X_{ot}$. Na otimização foi utilizada como estimativa inicial para o tempo ótimo o valor de 3 dias e foi utilizada a seguinte condição restritiva: para $t \leq 0$, $P_x = 0$. Os resultados obtidos na otimização são apresentados na tabela 4-14.

Tabela 4- 14 Valores de produtividade máxima estimada para os experimentos realizados no reator de 18 litros.

Experimento	P_{max} (g/L dia)	t_{ot} (dias)	X_{ot} (g/L)
1	0,0746	2,30	0,225
2	0,0361	1,61	0,136
3	0,0231	0,0002	0,112
4	0,0349	1,59	0,125
5	0,0477	1,38	0,135
6	0,0664	2,76	0,249
7	0,0368	3,04	0,191
8	0,0314	8,11	0,336
9	0,0534	3,94	0,260

Os resultados apresentados na Tabela 4.14 mostram que o método de otimização convergiu para os pontos de máxima produtividade apresentados na Figura 4.11. Os experimentos 1, 6 e 9, apresentaram valores mais elevados para ambos, P_{max} (maiores que $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e X_{ot} (maiores que 0,02) indicando que as condições utilizadas nesses experimentos são as mais promissoras para uma maior produtividade em biodiesel de microalgas, uma vez que a produtividade em biodiesel é diretamente proporcional a esses parâmetros.

A Tabela 4.15 apresenta a ANOVA dos efeitos sobre a produtividade máxima em células.

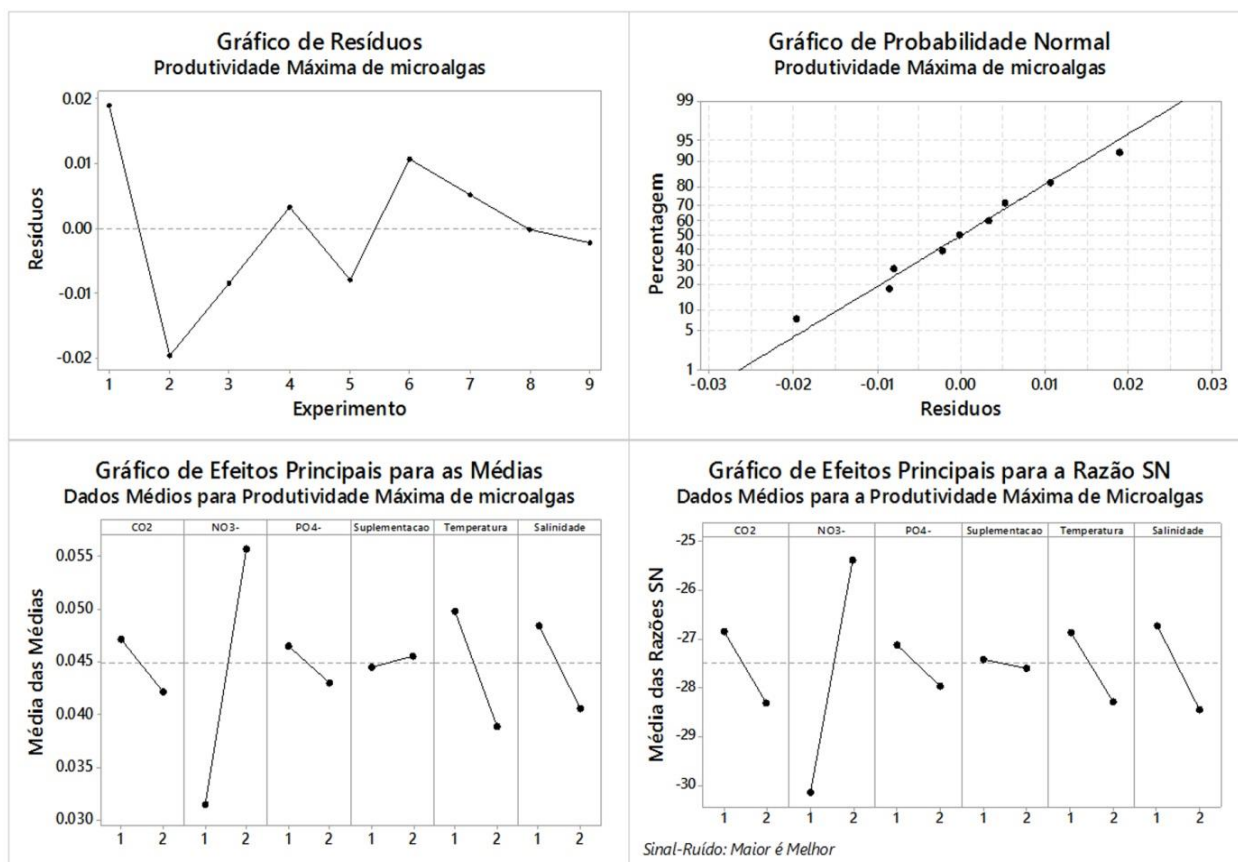
Tabela 4- 15 Análise da variância (ANOVA) dos efeitos sobre a produtividade máxima

Efeitos	Variável de resposta (P_{max})
	(valores de p)
	P_{max}
CO ₂	0,693
NO ₃ ⁻	0,021
PO ₄ ⁻	0,786
Suplementação	0,930
Temperatura	0,375
Salinidade	0,532

A Tabela 4-15 mostra que somente a concentração de nitrato é significativa para o nível de confiança de 95 %, mesmo resultado observado para a velocidade máxima de crescimento.

A Figura 4.11 apresenta os gráficos de resíduos e de probabilidade normal para a concentração máxima de microalgas em função da concentração de nitrato e os gráficos de efeitos para as médias e para a razão sinal-ruído.

Figura 4.11. Gráficos de resíduos e de probabilidade normal para a concentração máxima de microalgas em função da concentração de nitrato e os gráficos de efeitos para as médias e para a razão sinal-ruído



A Figura 4.11 mostra que o efeito principal sobre a produtividade máxima de microalgas é a concentração de nitrato que maximiza a produtividade máxima em células para o nível alto, como nos experimentos 1, 6 e 9.

Os resultados obtidos na modelagem da cinética de crescimento forneceram um indicativo das condições de cultivo que maximizam a produtividade de microalgas. Para futuros trabalhos existe a necessidade de se levantar dados experimentais para a obtenção de um modelo cinético para a produção de lipídeos pelas microalgas a fim de se maximizar sua produtividade e estabelecer tanto as melhores condições de cultivo quanto o melhor tipo e forma de operação do fotobiorreator.

4.5 Caracterização da matéria-prima lipídica obtida da microalga *C. minutissima* cultivada no fotobiorreator construído

4.5.1 Perfil de ácidos graxos e Teor de Ácidos graxos livres (FFA)

O material lipídico resultante da microalga *Chlorella minutissima* foi caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos e comparado com perfis de outras matérias-primas lipídicas empregadas na síntese de biodiesel, conforme mostra a tabela 4-16. Revelou uma composição química de aproximadamente 68% de ácidos graxos saturados dentre os quais se destacam em maior proporção os ácidos palmíticos (57,11%) e esteárico (5,92%). Os demais 32% são constituídos de ácidos graxos insaturados, com destaque para o ácido graxo oleico (26,30%). Figura 4-5 pode-se verificar o aspecto do material lipídico (óleo) resultante da microalga *Chlorella minutissima*.

Figura 4-5 Material lipídico (óleo) obtido da microalga *Chlorella minutissima*



Fonte: Próprio Autor

Tabela 4- 16 Perfil de ácidos graxos (%) de diferentes micro-organismos oleaginosos e óleo de palma

Ácido graxo	<i>Chlorella minutissima</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Chlorella</i> sp.	Óleo de palma
Saturado				
C 6:0 capróico	-	0,08	0,12	-
C 8:0 caprílico	-	0,63	8,22	-
C 10:0 cáprico	-	0,89	3,90	-
C 12:0 láurico	0,16	13,21	17,69	0,10
C 14:0 mirístico	0,95	5,17	6,25	1,20
C 15:0 pentadecanóico	0,21	0,12	0,31	-
C 16:0 palmítico	57,11	24,34	20,69	46,8
C 17:0 margárico	0,15	0,17	0,23	-
C 18:0 esteárico	5,92	4,88	1,04	3,80
C 20:0 araquídico	3,31	0,29	0,41	-
C 22:0 behênico	0,34	0,24	0,48	-
C 24:0 lignocérico	0,23	0,09	0,72	-
Total	68,38	50,11	60,06	51,90
Monoinsaturado				
C 16:1 palmitoléico	2,55	1,11	4,17	-
C 17:1 cis-10-heptanodecenóico	0,31	0,07	0,09	-
C 18:1 Oleico	26,30	26,88	27,17	37,60
C 20:1 eicosenóico	0,35	0,36	0,27	-
C 22:1 Erúcico	-	2,50	-	-
C 24:1 nervônico	-	0,07	-	-
Total	29,51	30,99	31,70	37,60
Poli-insaturado				
C 18:2 linoléico	1,89	12,53	3,93	10,50
C 18:3 linolênico	0,22	2,35	4,33	-
Total	2,11	14,88	8,26	10,50
Não identificado	-	4,02	-	-
Referência	Neste trabalho	Da Rós <i>et al.</i> , 2012	Amaral <i>et al.</i> , 2015	Da Rós <i>et al.</i> , 2013b

Segundo Ramos e colaboradores (2009), altas proporções de ácido palmítico (C16:0) no material lipídico são favoráveis a boa qualidade do biodiesel como alto índice de cetano, uma medida adimensional que indica boa qualidade da ignição do combustível. Por outro lado, proporções elevadas de ácido linolênico (C18:3), podem 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).

Desta forma, a linhagem estudada no presente trabalho destaca-se como uma excelente opção de matéria-prima para obtenção de biodiesel, revelando uma composição satisfatória, pois apresenta alto teor de ácido palmítico (57,11%) e baixa quantidade de ácido linolênico (0,22%). Além disso, verifica-se que o perfil dos ácidos graxos é similar aos demais perfis apresentados por outros óleos microbianos que já foram testados na síntese de biodiesel.

Outro parâmetro importante na determinação das propriedades da matéria-prima precursora do biodiesel é o índice de acidez (IA) e teor de ácidos graxos livres (% AGL), tendo em vista que teores elevados de acidez podem comprometer o tipo de catálise empregado na reação de obtenção de biodiesel. Alguns autores relatam que matérias-primas lipídicas que apresentam porcentagem de ácidos graxos livres acima de 5% não são adequadas quando se utiliza a catálise básica na síntese de biodiesel (Porphy; Farid, 2012). Outros catalisadores são indicados nesse caso, sendo preferencialmente, ácidos ou lipases imobilizadas. A tabela 4-17 mostra a comparação do índice de acidez e teor de ácidos graxos livres (%AGL) de diferentes óleos microbianos.

De acordo com a tabela 4-17, nota-se que o índice de acidez da amostra do óleo microbiano obtido pela linhagem *Chlorella minutissima*, descrito em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, foi de 26,14 (mgKOH/g) e o teor de ácidos graxos livres foi de 12,77%. Pela análise da tabela 4-15, dentre as espécies mencionadas, verifica-se que o óleo obtido da linhagem de *Trichormus* sp. CENA77 foi o que apresentou menor índice de acidez e %AGL, seguida pela linhagem de *Chlorella minutissima*. O óleo oriundo da linhagem *Chlorella* sp., forneceu o maior valor para IA e %AGL, 32,70 e 18,70 respectivamente, e mesmo assim não foi um fator limitante na síntese de biodiesel, visto que, em estudos efetuados anteriormente, essa fonte de matéria-prima lipídica atingiu uma conversão de 78,4% em ésteres alquílicos via catálise ácida homogênea (Amaral et al., 2015).

Tabela 4- 17 Índice de acidez e teor ácidos graxos livres das microalgas *Chlorella minutissima* e *Chlorella sp.* e da cianobactéria *Trichormus sp.*

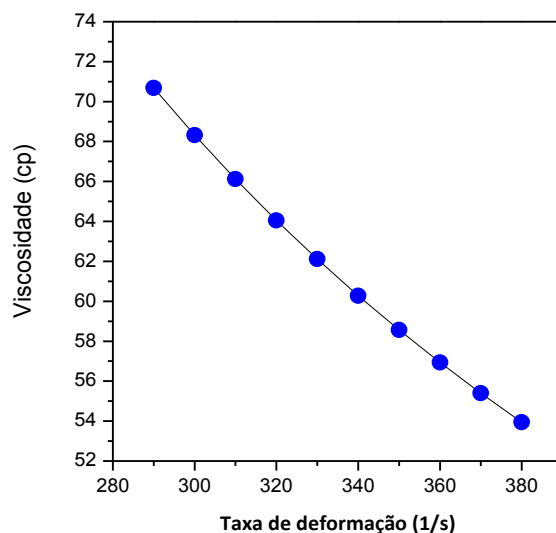
Linhagem	Índice de acidez (IA) mgKOH/g	% AGL	Referência
<i>Chlorella minutissima</i>	26,14	12,77	Presente trabalho
<i>Chlorella sp.</i>	32,70	18,70	Amaral <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichormus sp.</i>	15,74	9,00	Da Rós, 2012

4.5.2 Estudo reológico

O estudo reológico de óleos utilizados como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel é um dos parâmetros mais relevantes para avaliar as características do biocombustível obtido em relação à matéria-prima precursora. Um determinado fluido que possui a relação entre tensão e taxa de deformação igual a uma constante, independentemente do tempo e da deformação, é classificado como newtoniano. Para líquidos viscosos essa constante de proporcionalidade é chamada de viscosidade Newtoniana. Contrariamente, fluidos que apresentam uma curva de fluxo não linear, ou seja, fluidos nos quais a viscosidade é dependente do tempo ou da deformação, são denominados de não newtonianos (BRETAS; D'ÁVILA, 2005; FERREIRA *et al.*, 2005).

A Figura 4-6 mostra a variação da viscosidade em função da taxa de deformação para o comportamento da viscosidade absoluta da matéria-prima lipídica proveniente da *Chlorella minutissima*.

Figura 4-6 Gráfico da viscosidade em função da taxa de deformação



Conforme pode ser observado, o valor da viscosidade (cP) diminuiu acentuadamente com o aumento da taxa de deformação aplicada, caracterizando o comportamento desse óleo como líquido não newtoniano. A análise do comportamento da curva permitiu o ajuste da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação de acordo com a lei de potência. O valor do coeficiente angular foi menor que 1 ($N = 0,40$), o que caracteriza esse fluido como pseudoplástico, em que a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento (DANTAS et al., 2006). O mesmo comportamento foi observado para outros óleos microbianos, obtidos de diferentes linhagens de cianobactérias, tais como: *M. aeruginosa*, *Trichormus* sp. e *Synechococcus* sp., conforme descrito no trabalho de Da Rós et al., 2013b.

Dentro da faixa de deformação aplicada (280 a 380 s^{-1}), o material lipídico da biomassa da *Chlorella minutíssima* apresentou viscosidade absoluta média de $61,20 \text{ cP}$, medida à 50°C . A tabela 4-16 apresenta os valores de viscosidade de diferentes matérias-primas lipídicas, todos medidos à 50°C .

Tabela 4- 18 Comparação dos valores de viscosidade absoluta (cP) de diferentes fontes de matérias-primas lipídicas empregadas na produção de biodiesel

Matéria –prima lipídica	Viscosidade (cP)	Referência
<i>Chlorella minutissima</i>	61,20	Presente trabalho
<i>M.aeruginosa</i>	57,20	Da Rós et al., 2013b
<i>Trichormus sp.</i>	59,30	Da Rós et al., 2013b
<i>Synechococcus sp.</i>	62,30	Da Rós et al., 2013b
Sebo bovino	43,82	Moreira et al., 2007;
Óleo de palma	31,12	Carvalho,2011

De acordo com Tabela 4- 18 pode-se observar que os valores de viscosidade dos materiais lipídicos das linhagens de cianobactérias variaram entre 52,7 a 62,3 cP. O menor valor de viscosidade foi obtido para *M. aeruginosa* (52,7 cP), seguido da *Trichormus sp.* (59,1 cP) e *Synechococcus sp.* (62,3 cP). Ao comparar esses valores com os valores de viscosidade das matérias-primas lipídicas tradicionais, como óleo de palma (31,12 cP) e sebo bovino (43,82 cP), pode-se observar que as matérias-primas lipídicas das linhagens de cianobactérias e da microalga *Chlorella minutissima* possuem valores mais elevados de viscosidade. Além disso, elas apresentam um comportamento reológico diferente, uma vez que óleos vegetais e gorduras residuais apresentam comportamento de fluido Newtoniano e o óleo microbiano apresenta comportamento de fluido não newtoniano. (MOREIRA et al., 2007; DA RÓS et al., 2010; DA RÓS et al., 2013b).

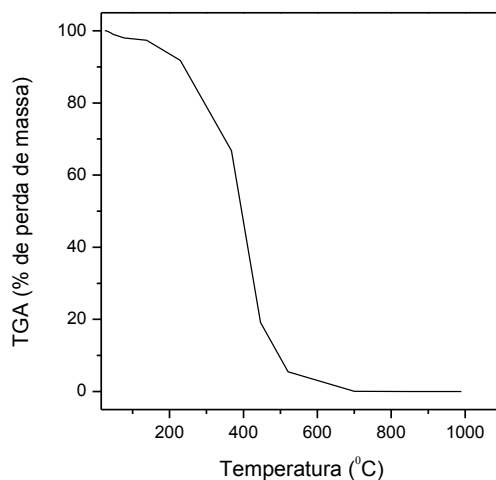
Segundo Silva e colaboradores (2012), reações de síntese de biodiesel a partir de matérias-primas lipídicas com alta viscosidade, como por exemplo, o sebo bovino (43,83 cP), resultam em ésteres de etila com valores de viscosidade dentro das normas da ANP para uso como combustível. Logo, a elevada viscosidade da biomassa lipídica não pode ser considerada um parâmetro restritivo para dimensionamento de reatores para a produção de biodiesel, apenas uma limitação que deve ser considerada e exige uso de solventes no meio reacional, principalmente pelo comportamento não newtoniano da matéria lipídica.

4.5.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TGA) vem sendo muito utilizada para estudar o comportamento de combustão da biomassa, que pode ser definida como uma volatilização inicial e combustão volátil seguida por uma queima vagarosa do carvão (Ross *et al.*, 2008). Além disso, possibilita estabelecer parâmetros comparativos entre a estabilidade térmica das matérias-primas lipídicas com o biodiesel.

Figura 4-7 Curva de decomposição térmica (TGA) mostra a curva de decomposição térmica (TGA) do material extraído da biomassa de *Chlorella minutissima*, que fornece os percentuais de perda de massa em função da temperatura. Verifica-se que ocorreu apenas uma etapa de perda de massa durante o aquecimento da matéria-prima lipídica oriunda da biomassa de *Chlorella minutissima* em atmosfera inerte. A etapa de perda de massa iniciou-se em 209 °C e se estendeu até aproximadamente 590 °C. Essa etapa está relacionada com a decomposição e/ou volatilização do material lipídico presente na amostra (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres). Durante essa etapa, a temperatura de máxima perda de massa constatada pela derivada da curva DTG ocorreu a 395 °C. Com relação a etapa inicial de perda de massa, o resultado obtido pela TGA do óleo microbiano de *Chlorella minutissima* foi similar ao obtido pelos óleos de babaçu (200 °C) e sebo bovino (210 °C), no estudo realizado por Carvalho (2011). Além disso, o resultado obtido indicou similaridade entre o intervalo em que ocorre a perda de massa para o sebo bovino: 200 a 560 °C (CARVALHO, 2011).

Figura 4-7 Curva de decomposição térmica (TGA)



4.5.4 Síntese do biodiesel

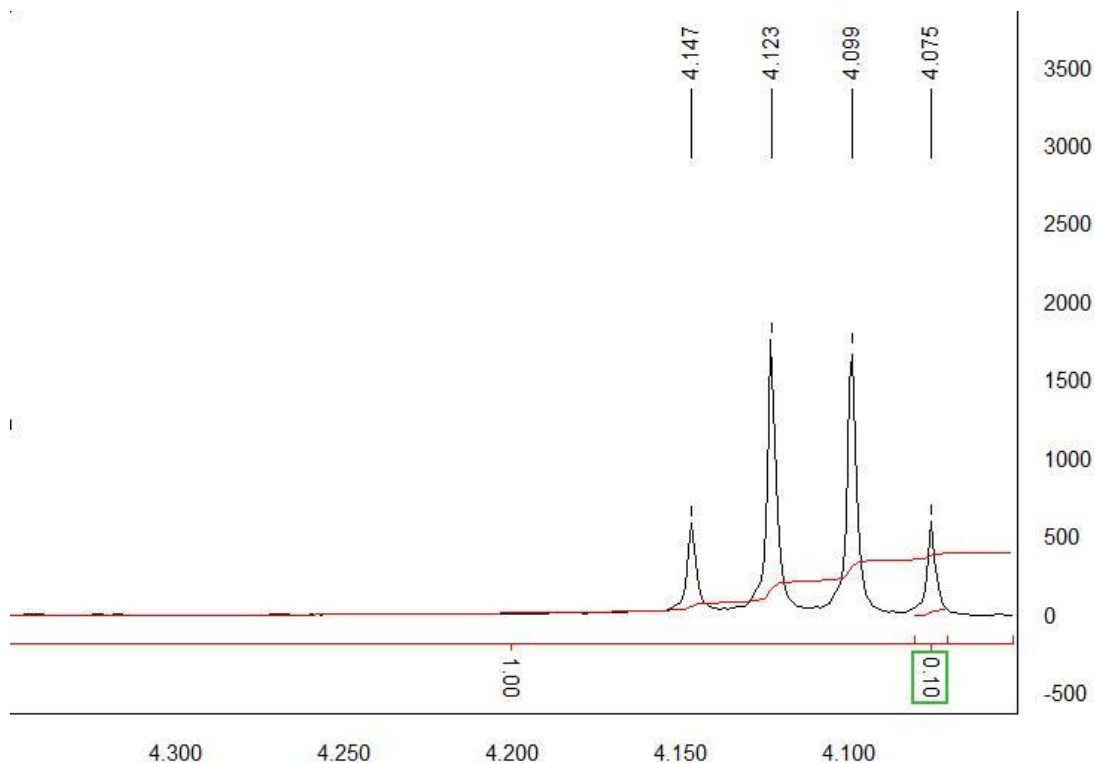
A partir do material lipídico obtido foram adotadas as condições descritas no item 3.1.7.7 (Materiais e métodos) para a síntese do biodiesel e quantificado segundo a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H).

As amostras de biodiesel foram quantificadas empregando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H), a qual permite avaliar a conversão das matérias-primas lipídicas em biodiesel, possibilitando assim confirmar a ocorrência da reação de transesterificação do triglicérido e a sua conversão em ésteres etílicos. Essa técnica vem sendo muito utilizada recentemente por requerer uma quantidade mínima de amostra na análise, além de ser uma análise rápida (CARVALHO, 2011).

A Figura 4-8 ilustra o espectro de RMN¹H referente a amostra de biodiesel. Vale a pena ressaltar que nesse trabalho não houve o intuito de estudar a etapa de síntese do biodiesel, apenas demonstrar que os lipídeos extraídos da microalga marinha *Chlorella minutissima* são passíveis de transformação em biodiesel, desse modo utilizou-se a síntese por via química que atingiu uma conversão de 80% calculado a partir do espectro da ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel apresentado na Figura 4-8.

Haja vista que não foi utilizado nenhum planejamento experimental para melhoria na reação de síntese de biodiesel, a conversão obtida pode ser considerada satisfatória, uma vez que, Ehimem (2010) reportou, o uso de 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.*

Figura 4-8 Ressonância magnética nuclear do biodiesel da microalga marinha *Chlorella minutissima*



A

tabela 4-19 demonstra uma comparação na produção de biomassa e produção de lipídios, obtidas de diferentes linhagens de *Chlorella*.

Tabela 4-19 Comparação na produção de Biomassa e Lipídios obtidas de diferentes linhagens de *Chlorella*

Linagem	Biomassa g/l	% Lipídios	Referência
<i>Chlorella minutissima</i>	0,245	37,08	Presente trabalho
<i>Chlorella</i> sp.	0,40	12,32	Amaral , 2014
<i>Chlorella</i> sp.	4,5	25,4	Cheirsilp and Torpee ,2012
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,127	18	Subhasha,Prakash , Sharma ,20011
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1,3	28,9	Kanaga, 2016
<i>Chlorella Vulgaris</i>	1,9	25	Najafabadi et al., 2015

Os resultados obtidos neste trabalho quando comparados com alguns relatos encontrados na literatura, demonstraram resultados satisfatórios, com um aumento no percentual de lipídeos em um menor número de células, comprovando a eficiência dos métodos estatísticos que foram utilizados nesse estudo, a fim de maximizar a produção de óleo e concentração celular de forma conjunta. Desta forma, este estudo permitiu estabelecer as melhores condições que favorecem o aumento da produtividade lipídica da linhagem da microalga marinha *Chlorella minutissima*.

5 CONCLUSÃO

Foi efetuado um extenso trabalho experimental, os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e considerando o intervalo experimental utilizado neste trabalho é possível concluir que:

- O estabelecimento das condições adequadas de cultivo foi efetuado por meio do planejamento experimental via método de Taguchi, verificando a influência da concentração de nitrato no nível máximo, e as demais variáveis significativas: concentração de fosfato, suplementação e temperatura, no nível mínimo. Nas faixas de trabalho estudadas modelos matemáticos foram propostos que permitiram estabelecer condições otimizadas de cultivo solucionando o conflito gerado pelo fator concentração de NaNO_3 e encontrar o melhor ajuste para maximizar a concentração de biomassa e teor lipídico
- Os resultados obtidos por meio do planejamento experimental via método de Taguchi, serviu como base para a modelagem fenomenológica como alternativa na otimização da velocidade de crescimento populacional das microalgas onde foi considerado o modelo cinético de crescimento logístico. Verificou-se que o crescimento celular e a produtividade de lipídeos são significativamente dependentes da concentração inicial de nitrato, do fluxo de dióxido de carbono, da concentração de fosfato, da suplementação e da temperatura. Foram obtidos melhores valores, tanto para o crescimento quanto para a produtividade de lipídeos, para a concentração de nitrato no nível alto e os demais parâmetros significativos no nível baixo. O modelo logístico foi capaz de representar a cinética de crescimento para a microalga *Chlorella minutíssima*, sendo obtidos parâmetros significativos para o nível de confiança de 95% segundo o teste *t* de Students, a regressão foi significativa segundo o teste *F* de Fischer para o nível de confiança de 95%;

- A partir da metodologia empregada, utilizando o planejamento L8 de Taguchi e o modelo cinético logístico foi possível indicar as melhores condições de cultivo para o processo, indicando a utilização da concentração de nitrato no nível máximo, e as demais variáveis significativas: concentração de fosfato, suplementação e temperatura, no nível mínimo;
- A produtividade ótima em células é menor que 7 dias, sugerindo que o estudo do processo em duas etapas, uma de crescimento e outra de produção de lipídeos, pode ser uma alternativa interessante para aumentar a produtividade em lipídeos no processo por meio da diminuição do tempo total da batelada.
- A produtividade em células é maior para o NO_3^- (variável significativa) no nível máximo.
- Os resultados obtidos mostraram que a configuração do fotobioreatores tubulares descontínuos, tipo coluna de bolhas, foi adequada para o cultivo da microalga *Chlorella minutíssima*, apresentando resultados altamente satisfatórios de teor de lipídeos, da ordem de $37,08 \pm 1,50$ % em relação à biomassa seca.
- Como o óleo obtido foi realizada uma reação, empregando catalisador químico (H_2SO_4). O resultado obtido demonstrou que o catalisador atuou de forma eficiente, convertendo os ácidos graxos em seus respectivos ésteres de etila, conversão de 80%. Outro fator que é importante ressaltar foi a ausência de pigmentos presente no material lipídico Figura 4-5 visto que o óleo extraído apresentou coloração amarelada similar aos óleos vegetais tradicionais, como por exemplo, o óleo de soja, apresentando vantagens adicionais perante a diversas matérias-primas lipídicas com presença de pigmentos.
- A metodologia utilizada e os resultados obtidos nesse trabalho podem contribuir com a busca pela viabilização econômica da produção de biodiesel de microalgas.

5.1 Sugestões para Trabalhos Futuros

5.1.1 Quanto aos Métodos Matemáticos:

- Utilização das ferramentas DOE nos processos de colheita e extração da biomassa, para que possam ser otimizadas a fim de reduzir os custos do processo.
- Aplicar o Método de superfície de Resposta a fim de fazer o caminho ascendente até atingir o Experimento rotacionado.
- Baseado em resultados obtidos no presente trabalho de pesquisa, sugere-se realizar os experimentos sem duas etapas, uma primeira visando o crescimento das microalgas e uma segunda etapa para a produção de lipídeos. Ambas as etapas utilizando o Método de Taguchi seguido de modelagem fenomenológica, que poderá contribuir para a viabilidade da produção de biodiesel de microalga.
- Utilizar Algoritmos como ferramenta de otimização.

5.1.2 No que diz respeito ao fotobiorreator desenvolvido:

- Aprimorar o sistema de agitação entre os tubos para diminuir a possibilidade de deposição e morte celular.
- Avaliar a possibilidade do uso de luz adicional nos cultivos.
- Usar sensores eletroquímicos para medir com precisão as taxas de assimilação de dióxido de carbono.
- Usar sensores para o monitoramento online do crescimento celular.

5.1.3 Em relação ao cultivo da microalga:

- Melhorar o sistema de floculação para extração da biomassa, verificando, por exemplo, a utilização de eletroflotação e floculação com fungos.
- Avaliar a tolerância da espécie em estudo bem como outras espécies, quanto ao cultivo utilizando gases de exaustão como fonte de CO₂ inorgânico.

5.1.4 Quanto à obtenção de energia: Termoeconomia

- Afim de tornar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas mais atrativo do ponto de vista econômico seria a implementação de biorefinaria, onde toda a biomassa de microalgas seria utilizada para a produção de diversos produtos entre eles, vários tipos de biocombustíveis, além do biodiesel e outros co-produtos de alto valor agregado.
- Realizar análises com relação aos custos de produção do biodiesel bem como sua capacidade energética; Análise termoeconomica.
- Obter biodiesel mediante catálise (ácido, básica e enzimática) do óleo de *C. minutíssima*, bem como a realização de testes quanto aos parâmetros de qualidade estipulados pela Agência Nacional de Petróleo (ANP).
- Realizar uma Análise de Ciclo de Vida do processo produtivo para estudo da sustentabilidade econômica e ambiental do sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, A.E.M., GHOSH, D., HALLENBECK, P.C., 2014. Characterization of growth and lipid production by *Chlorella* sp. PCH90, a microalga native to Quebec. **Bioresource. Technol.** 156, p. 20–28, 2013.

ADENLE A. A.; HASLAM GE, LEE L. Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries. **Energy Policy**, 61, p. 182–95, 2013.

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.; MANN, D.G.; MCCOURT, R.M.; MENDONZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIGDE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W. & TAYLOR, M.J.R. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiologia.*, v. 52, p.399–451; 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (Brasil). Biocombustíveis: O que são os biocombustíveis. 2012. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em: 14 março 2016.

AHMAD, A. L.; MAT YASIN, N. H.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 584-593, 2011.

AIDAR, E.; GIANESELLA-GALVÃO, S.M.F.; SIGAUD, T.C.S. et al. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photosynthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kylin) Butcher. *J. Exp. Mar. Biology Ecology*, v. 180, p. 175-187, 1994.

ALAMF, D. A.; RASJIDIN, R.; MOBIN, S.; MORIA, H. B. A. Biofuel from algae – is it a viable alternative? *Procedia Eng.*, v.49, p. 221–227, 2012.

AUGUSTO, JOSÉ A. SOARES, Dep. de Física da FCUL, 2007.

AMARAL, M.S., **Cultivo da microalga marinha *Chlorella* sp. como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.** 2014.109p:il. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Bicatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

AMARAL, MATEUS S.; LOURES, CARLA C.; DA RÓS, PATRÍCIA C.M.; MACHADO, SARA A.; REIS, CRISTIANO E. R.; DE CASTRO, HEIZIR F.; SILVA, MESSIAS B. Evaluation of the cultivation conditions of marine microalgae *Chlorella*

sp. to be used as feedstock in ultrasound-assisted ethanolysis. **Biofuel Research Journal**, v. 2, p. 288-294, 2015.

AMIN S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy Convers Manag**, v. 50, 1834–1840, 2009.

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. Elsevier academic press.2005. p. 565.

ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso em: 14 março. 2016.

ANTONY, J., ANAND, R.B., KUNAR, M., TIWARI, M.K. Multiple response optimization using Taguchi methodology and neuro-fuzzy based model. **Journal of Manufacturing Technology Management**, v. 17, p.908 – 925, 2006.

ARANDA, M. H.; JUNG, C. F.; TEN CATEN, C. S. Aplicação do Projeto de Experimentos para Otimização de uma Inovação Tecnológica. **Revista Gestão Industrial**, v. 4, p. 116-132, 2008.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M.K.; ABDUL A. A. Biodiesel separation and purification: a review. **Renewable Energy**, v. 36, p. 437-443, 2011.

BADDILEY, J. et al., In. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, Cambridge, New York 1994.

BANSE, M.; VAN MEIJL, H.; TABEAU, A.; WOLTJER, G. Will EU. Biofuel Policies affect Global Agricultural Markets? **Agricultural Economics Research 92 Institute (LEI)**, Wageningen UR, The Hague, 2008. Disponível em: < <http://edepot.wur.nl/38099>>. Acesso em: 13 março 2016.

BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; de Lima, D. P.; **Quim. Nova**, 34, 306. 2011

BECKER. E.W. Handbook of microalgal mass culture, CRC Press, Boca Raton, FL, 1986. 339-420p. apud SÁNCHEZ, S.; MARTINEZ, M.E.; ESPINOLA, F. Biomass production and biochemical variability of marine microalga *Isochrysis galbana* em relation to culture medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 13-18, 2000.

BECKER. E.W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnology advances, Oxford**, v. 5, p. 207 – 210, 2007.

BEETUL, K., SADALLY, S.B., TALEB-HOSSENKHAN, N., BHAGOOI, R., PUCHOOA, D. An investigation of biodiesel production from microalgae found in mauritian waters. **Biofuel Research.**, v. 2, p. 58-64, 2012.

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

BERTO, ROSA MARIA VILLARES DE SOUZA; NAKANO, DAVI. **Revisitando a produção científica nos anais do Encontro Nacional de Engenharia de Produção.** Prod., São Paulo, v. 24, n. 1, p. 225-232, Mar. 2014.

BERTRAND, J. W. M.; FRANSOO, J. C.; Modelling and simulation - operations management research methodologies using quantitative modeling. **International Journal of Operations & Production Management.** V. 22, n.3, 241-264, 2002.

BEZERRA, M.A., SANTELLI, R.E., OLIVEIRA, E.P., VILLAR, L.S., ESCALEIRA, L.A., 2008. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** Talanta V.76, P.965–977,2008.

BAZGAN, C.; JAMAIN, F.; VANDERPOOTEN, D., **Approximate Pareto sets of minimal size for multi-objective optimization problems,** Operations Research Letters, v. 43, n. 1, p. 1-6, 2015.

BHATNAGAR, A., BHATNAGAR, M., CHINNASAMY, S., DAS, K., 2010. **Chlorella minutissima— a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 161, 523–536, 2010.

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

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology,** v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.

BRANDINI, F. Biodiesel, a bola da vez. Disponível em: http://www.oeco.com.br/index.php/frederico-brandini/50-frederico-brandini/17106-oeco_24021. Acesso em: 14 março. 2016.

BRASIL, A. J. O. **Plano Nacional de Agroenergia. Embrapa Informação Tecnológica.** 2. ed. Brasília, 2006. 114 p.

BRASIL. B. S. A. F. Utilização de microalgas cultivadas em meio suplementado com vinhaça e gás carbônico para produção de biocombustíveis e coprodutos. Embrapa; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informação Tecnológica. **Plano Nacional de Agroenergia,** 2013.

BRENNAN L.; OWENDE P. Biofuels from microalgae -A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sustain Energy Rev,** v. 14, p. 557–577, 2010.

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

BRESSAN FILHO, A. A. C. **Biocombustíveis: O uso da biomassa como nova fonte energética mundial. In: Abastecimento e segurança alimentar: O crescimento da agricultura e a produção de alimentos no Brasil.** Brasília: CONAB, 2008. p.147 – 212.

BROWN, L. M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. **Energy Convers.** v. 37, p. 1363-1367, 1996.

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

BUTTON, S. T. **Metodologia para Planejamento Experimental e Análise de Resultados.** Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 88 p, 2005.

CASTILHO E. **Process Optimization a Statistical Approach,** 1th Edition, New York, Springer Science +Business Media, p. 80 ,2007.

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos.** 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2011.

CHAGAS, B.M.E. **Influenciado estresse nutricional programado na composição da Microalga *Marinha Isochrysis galbana*.** 2010. 128f. Dissertação (Mestrado) -Curso de Engenharia Química, UFRN, Natal, 2010.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology advances,** 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances.** New Zeland, 25, 294-306, 2007.

CLARENS, A.F.; RESURRECCION, E.P.; WHITE, M.A. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environ. Science Technol.,** 44, p. 1813–1819, 2010.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **Matriz energética: Cenários, oportunidades e desafios.** Brasília: CNI, 2007, 82 p. ISBN: 978-85-88566-66- 8.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A.; ORTIZ, E.Y. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing,** v. 48, p. 1146– 1151, 2009.

CORDEIRO, C. S. **Compostos lamelares como catalisadores heterogêneos em reações de (trans) esterificação (m) etílica.** 2008. 168 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008

CORREIA, E. A. S.; CARDOZA, J. A. S. **Planejamento de experimentos no processo produtivo utilizando o método Taguchi**. *Gestão da Produção Operações e Sistemas*, Bauru, v.6, n. 1, p. 55–66, jan. 2011.

COSTA J. A.; DE MORAIS, M. G.; The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2–9, 2011.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DA RÓS, P.C.M., SILVA, C.S.P., SILVA-STENICO, M.E., FIORE, M.F., DE CASTRO, H.F. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. **Mar. Drugs**, v.11, p. 2365-2381, 2013.

DAMASCENO, C. **Etanol de segunda geração: nova possibilidade de combustível renovável**. Disponível em: Acesso em: 03 janeiro, 2016.

DEMIRBAS A. Biorefineries: current activities and future developments. **Energy Convers Manag**, v. 50, p.2782–801, 2009.

DEMIRBAS A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Convers Manag**, v. 51, p. 2738–49, 2010.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, p. 3473-3480, 2011.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, p. 214–219, 1980.

DEHURI, S.; CHO, S.B., Multi-criterion Pareto based particle swarm optimized polynomial neural network for classification: A review and state-of-the-art, **Computer Science Review**, v.3, p. 19-40, 2009.

DOGARIS, I.; GKOUNTA, O.; MAMMA, D.; KEKOS, D.; **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p.541-550, 2013.

DUNSTAN, G.A.; VOLKMAN, J.K.; BARRETT, S.M. et al. Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **J. Appl. Phycol.**, v. 5, p. 71-83, 1993.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. **Fuel**, v. 89, p. 677-684, 2011.

FARAG, H. A.; EL-MAGHRABY, A.; TAHA, N. A. Optimization of factors affecting esterification of mixed oil with high percentage of free fatty acid. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 507-510, 2011

FAROOQ, M A; NÓVOA, HENRIQUETA; ARAÚJO, ANTÓNIO; TAVARES, SERGIO M.O. **An innovative approach for planning and execution of pre-experimental runs for Design of Experiments**. Investigações Europeas de Dirección y Economía de la Empresa ,2015

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M.F.; WHITNEY, R.A.; **Bioresource Technology**, 101, 8915-8922, 2010.

FONSECA, J. J. S. **Metodologia da pesquisa científica**. Fortaleza: UEC, 2002. Apostila.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Químca. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, 2013.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

G. NAJAFI, B. GHOBADIAN, T.F. YUSAF. Algae as a sustainable energy source for biofuel production in Iran: a case study. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 15, p. 3870–3876, 2011.

GERHARDT, T. E.; SILVEIRA, D. T. **Métodos de pesquisa**. 1. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009.

GIRARD, J.M.; ROY, M. L.; HAFSA, M.B.; GAGNON, J.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M.; TREMBLAY, R.; DESCHÊNES, J. S. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedes musobliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Res.**, v. 5, p. 241-248 2014.

GOMES, F. M. **Diferentes métodos de aglutinação para melhoria de processos com múltiplas respostas**.2015 .111 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2015.

GONÇALVES, R. H.; STURARO, J.R. **Aplicação da metodologia de superfície de resposta na otimização da remediação de um solo arenoso contaminado com cobre**. São Paulo, UNESP, Geociências, v. 29, p. 59-70, 2010

GOUVEIA L. **Microalgae as a feedstock for biofuels**. Springer; 2011.

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.

HARIDY, S.; GOUDA, S. A.; WU, Z. An integrated framework of statistical process control and design of experiments for optimizing wire electrochemical turning 85 process, **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v.53, p. 191-207, 2011.

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

HOSSAIN AK, DAVIES PA. Performance, emission and combustion characteristics of an indirect injection (IDI) multi-cylinder compression ignition (CI) engine operating on neat jatropha and karanj oils preheated by jacket water. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 332–342, 2012.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JERVIS, E. et al. Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied. Energy**, v. 87, p. 38–46, 2010.

IPCC. Climate Change 2007: Synthesis Report. **Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Core Writing Team, Pachauri, R. K.; Reisinger, A. (Eds.)]. IPCC, Geneva(Suíça), p.104, 2007.

JASSINNEE MILANO, HWAI CHYUAN ONG, H.H. MASJUKI, W.T. CHONG, MAN KEE LAM, PING KWAN LOH, VIKNES VELLAYAN. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, 2016.

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.

LOURES, C.C.A; IZÁRIO FILHO, H. J. ; OLIVEIRA, I. S. ; SAMANAMUD, G. R. L. ; ANDRÉ LUIZ SOUZA ; SILVA, M. B. . The Application of Response Surface Methodology in the Study of Photodegraded Industrial Dairy Effluents by the Photo-Fenton Process: Optimization and Economic Viability. **ISRN Chemical Engineering**, p. 1-9-9, 2014

HOU, J.; ZHANG, P.; YUAN, X.; ZHENG, Y. **Life cycle environmental impact assessment of biodiesel from microalgae in open ponds**. Transactions of the CSAE, v. 27, p. 251–257, 2011.

JALALIZADEH, M. **Development of an integrated process model for algae growth in a photobioreactor**. 2012, 76f. (Master's thesis), University of South Florida, Tampa, 2012.

JESUS, S.S.; FILHO, R.M. Modeling growth of microalgae *Dunaliella salina* under different nutritional conditions. **American. Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, p. 279-283, 2010.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S, NAMPOOTHIRI KM, PANDEY A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v.102:186–193, 2011.

KARATAPANIS, A. E.; FIAMEGOS, Y. C.; SAKKAS, V. A.; STALIKAS, C. D. **Effect of chromatographic parameters and detector settings on the response of HILIC–evaporative light-scattering detection system using experimental design approach.**

KHOO, H. H.; SHARRATT, P. N. D. P.; BALASUBRAMANIAN, R. K.; NARAHARISSETTI PK, S. S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminar results and comparisons. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5800–5807, 2010.

KOH, M. Y.; GHAZI, T. I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 2240– 2251, 2011.

KISHORE, R.A., TIWARI, R., DVIVEDI, A.; SINGH, I. Taguchi analysis of the residual tensile strength after drilling in glass fiber reinforced epoxy composites. 2009. **Materials and Design**, v. 30, p. 2186-2190, 2009.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. (2006). **Manual do Biodiesel**, São Paulo: EdgardBlucher.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estud. av., São Paulo, v. 24, n. 68, 2010.

KOLLER, M., MUHR, A., BRAUNEGG, G., Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Res.** v.6, p. 52-63, 2014.

L. JIANG, Y. ZHANG, X. FAN, et al., Effects of different cultivation modes on the biomass productivity of energy microalgae. **Renew. Energy Source**, 2010.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge, New York, Cambridge University Press, 2008.

LI, X.; WANG, H. A Stoichiometrically derived algal growth model and its global analysis. **Mathematical Biosciences and Engineering**, v. 7, p. 825–836, 2010.

LI, Z. et al. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9128–9134, 2011.

LONG, H. et al. Biomass resources and their bioenergy potential estimation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 344–352, 2013.

LOPES, E. J. **Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores.** 2007. Tese (Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química-Mestrado e Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. **Rima, São Carlos**, 2006. 606 p.

M. KOLLER, A; SALERNO, P.; TUFFNER, et al., Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. **Journal of Cleaner. Production**, v. 37, p. 377–388, 2011.

MENETREZ M.Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environmental Science Technology**. v. 46, p. 7073–7085, 2012.

MARQUARDT, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, p. 431–441, 1963.

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

MEHER, L.C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, p. 248- 268, 2006.

MENETREZ MY. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. *Environ Sci Technol*, v. 46, p. 7073–7085, 2012.

MERCHUK, J.C.; WU, X. Simulation of algae growth in a bench scale internal loop 111 airlift reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 2899–2912, 2004.

MIGUEL, P. A. C. **Metodologia de Pesquisa em Engenharia de Produção e Gestão de Operações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Campus-Elsevier. v.1, 260p, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Embrapa Agroenergia). Potencial e perspectivas da utilização de microalgas para produção de biocombustíveis. **Agrishow**, 2014.

MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, 703-712, 2006.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 7 ed. USA: John Wiley&Sons, 2008.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 5th ed. New York: Jonh Wiley and Sons, 2001. 684 p.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T.V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**., v. 7, p. 117-123, 2015.

MUÑOZ, R.T. **Algal-bacterial photobioreactors for the degradation of toxic organic pollutants**. Doctoral Dissertation. Lund University, Sweden, 2005.

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

NAJAFI, G.; GHOBADIAN, B.; YUSAF, T. F. Algae as a sustainable energy source for biofuel production in Iran: a case study. **Renew Sustain Energy**, v. 15, p. 3870–3876, 2011.

NDIMBA, B.K.; NDIMBA, R.J.; JOHNSON, T.S.; WADITEE-SIRISATTHA, R.; BABA, M.; SIRISATTHA, S. S. Y.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL R. Biofuels as a sustainable energy source: an update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. **Journal of Proteome Research**, v. 93, p.:234–244, 2013.

NEJAT, P.; FATEMEH, J.; MOHAMMAD, M. T.; MOHAMMAD, G.; MUHD, Z. A. M. A Global Review of Energy Consumption, CO₂ Emissions and Policy in the Residential Sector (with an Overview of the Top Ten CO₂ Emitting Countries). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 843–62. 2015.

NETRAVALI, A.N.; CHABBAS. **Composites get greener**. *MaterialsToday*, v.6, p.22-9, 2003.

NOBRE, B.P.; VILLALOBOS, F.; BARRAGÁN, B.E.; OLIVEIRA, A.C.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. et al. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga — extraction of oils and pigments. production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresour Technol**, v. 135, p.128–136, 2013.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. **Biosystems Engineering**, v. 95, p. 597-606, 2006.

PAIVA, E. J. **Otimização de Manufatura com Múltiplas Respostas baseadas em índices de capacidade**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.

PANDEY, RUPESH KUMAR; PANDA, S.S. Multi-performance optimization of bone drilling using Taguchi method based on membership function. **Measurement**, v.59, p. 9–13, 2015.

PATIL, P. D. et al. Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 118–122, 2011.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, E Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2010.

PETKOV, G.; IVANOVA, A.; ILIEV, I.; VASEVA, I. Acritical look at the microalgae biodiesel. **European Journal**, v. 114, p.103-111, 2012.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; MICHELLE, J.C.R.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A. P.; ANDRADE, B.A. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p.1313-1330, 2005.

PHOLDEE, NANTIWAT; BUREERAT, SUJIN. Comparative performance of meta-heuristic algorithms for mass minimisation of trusses with dynamic constraints. 2014. **Advances in Engineering Software**, v.75, pg.1–13, 2014.

POROCH-SERITAN, M.; GUTT, S.; GUTT, G.; CRETESCU, I.; COJOCARU, C.; SEVERIN, T. Design of experiments for statistical modeling and multi-response optimization of nickel electroplating process. **Chemical Engineering Research and Design**, v.89, p.136–147, 2011.

PRAGYA N, PANDEY KK, SAHOO PK. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renew Sustain Energy**, v. 24, p. 159–71, 2013.

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.

PRUVOST, J.; CORNET, J.F.; LE BORGNE, F.; GOETZ, V.; LEGRAND, J. Theoretical investigation of microalgae culture in the light changing conditions of solar photobioreactor production and comparison with cyanobacteria. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, 2015.

RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 2979–2985, 2010.

RAISSI, S.; FARSANI, R. E. F. Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology. World Academy of Science, **Engineering and Technology** 51, 267-271, 2009.

RANA, R. S.; PUROHIT, R.; SHARMA, A. K.; RANA, S. Optimization of Wear Performance Composites Using Taguchi Method. **Procedia Materials Science**, v.6, p. 503 – 511, 2014

RAZZAK, S.A.; HOSSAIN, M.M.; LUCKY, R.A.; BASSI AS, D. L. H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 27, p. 622–653, 2013.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, p. 195-214, 2002.

RITTMANN, B.E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, p. 203-212, 2008.

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

RODRIGUES, J.A. Biorrefinaria, usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **QuímicaNova**, v.34, p. 1242-1254, 2011.

SAMANAMUD, G. L.; Izário Filho, Hécio José ; LOURES, C. C. A. ; OLIVEIRA, I. S. ; Souza, A. L. ; Freitas, A. P. B. R. ; Ruoting Pei . The Application of Surface Response Methodology in the Solar/UV Induced Degradation of Dairy Wastewater using immobilized ZnO as semiconductor. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

SAMIMI, A.; ZARINABADI, S. Reduction of Greenhouse gases emission and effect on environment. **Journal of American Science**, v. 8, p. 1011–1015, 2012.

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.

SCOTT, S.A.; DAVEY, M.P.; DENNIS, J.S.; HORST, I.; HOWE, C.J.; LEA-SMITH, D.J.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnology*, v. 21, p. 277–86; 2010.

SCRAGG, A. H.; MORRISON, J.; SHALES, S. W. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 884 - 889, 2003.

SILVA H. A.; SILVA M. B. Aplicação de um projeto de experimentos (DOE) na soldagem de tubos de zircaloy-4. **Produção&Engenharia**, São Paulo, v.1, p. 41-52, 2008.

SILVA, D. A. S. **Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, 2014.

SILVA, M. B.; CARNEIRO, L. M. ; SILVA, J. P. A. ; DOS SANTOS OLIVEIRA, I. ; FILHO, H. J. I. ; ALMEIDA, C. R. A. An Application of the Taguchi Method (Robust Design) to Environmental Engineering: Evaluating Advanced Oxidative Processes in

Polyester-Resin Wastewater Treatment. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 828-837, 2014.

SILVA, T.C.F. **Processos oxidativos avançados para o tratamento de efluentes de indústria de celulose Kraft branqueada**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PELICIONE, L. C.; OLIVERA, A. Use of inorganic (NPK) and the Chu12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. **Brazilian Journal of Ecology**, v. 3, p. 32-37, 1999.

SOUZA, A. L. ; IZARIO FILHO, H. J. ; PEIXOTO, A. L. C. ; GUIMARAES, O. L. C. ; LOURES, C. C. A. ; LAMAS SAMANAMUD, G. R. ; SILVA, M. B. Effects of ferric ions on the catalytic ozonation process on sanitary landfill leachates. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 48-61, 2013.

SOUZA, H. J. C.; MOYSES, C. B.; PONTES, F. J.; DUARTE, R. N.; SILVA, C. E. S.; ALBERTO, F. L.; FERREIRA, U. R.; SILVA, M. B. Optimization Molecular assay optimized by Taguchi experimental design method for venous thromboembolism investigation. **Molecular and Cellular Probes**, Sidney, v.25, n. 1, p. 231-237, dez 2011.

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

SUBHADRA BG. Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. **Energy Policy**, v. 38, p. 5892–5901, 2010.

SURENDRHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIVAPRAKASH, B.; SIRAJUNNISA, A. Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production. **Biotech**, v. 5, p. 663-669, 2015.

T. SUGANYA et al. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941 ,2016.

TAN, C.H.; SHOW, P.L.; CHANG, J-S.; LING, T.C.; LAN, J. C-W. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. **Biotechnol. Adv.**, v. 33, p. 1219-1227, 2015.

TANSEL, I.N.; GULMEZ, S.; DEMETGUL, M.; AYKUT, S. Taguchi Method–GONNS integration: Complete procedure covering from experimental design to complex optimization. **Expert Systems with Applications**, v. 38, p. 4780–4789, 2011.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **England: Blackwell Publishing**, 2004. p. 3-19.

TRIPATHI, L.; MISHRA, A. K.; DUBEY, A. K.; TRIPATHI, C. B. Renewable energy: An overview on its contribution in current energy scenario of India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 226–233, 2016.

UGWU, C.; AOYAGI, H. e UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, 2008.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, 1998.

GUPTA, V.K.; TUOHY, M. G. **Biofuel technologies: recent developments**. Springer, Berlin Heidelberg (2013).

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

VANTHOOR-KOOPMANS M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M.J.; EPPINK, M.H.M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresour Technol**, v. 135, p. 142–149, 2013.

VASTEMAN, V.; ROOMAN, M.; BOGAERTS, P. A robust method for the joint estimation of yield coefficients and kinetic parameters in bioprocess models. **Biotechnology Progress**, vol. 25, n. 3, p. 606-618, 2009.

VELASQUEZ-ORTA, S. B.; LEE, J.G.M.; HARVEY, A. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, v. 94, p. 544–550, 2012.

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, p. 1402-1411, 2010.

WALKER, T.; PURTON, S. e BECKER, D. Microalgae as bioreactors. **Plant cell reports**, v. 24, n. 11, p. 629-41, doi:10.1007/s00299-005-0004-6, 2005.

WANG, S.; HUANG, G.H. A multi-level Taguchi-factorial two-stage stochastic programming approach for characterization of parameter uncertainties and their interactions: An application to water resources management. **European Journal of Operational Research**, v. 240, p. 572–581, 2015.

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

WU, X. and MERCHUK, J.C. Simulation of Algae Growth in a Bench Scale Internal Loop Airlift Reactor. *Chemical Engineering Science*, v. 59, p. 2899-2912, 2004.

XIANSHENG, N.; ZHENGGAN, Z.; XINGWEI, W.; LUMING, L. The use of Taguchi method to optimize the laser welding of sealing neuro-stimulator. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 49, p. 297–304, 2011.

XU, Y.; BOEING W.J. Modeling maximum lipid productivity of microalgae: Review and next step. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 29-39, 2014.

YANG J.; RASA, E.; TANTAYOTAI, P.; SCOW K.M.; YUAN, H.; HRISTOVA, K.R. Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v.102, p. 3077–3082, 2011.

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.

ZASLAVSKAIA, L. A.; LIPPMEIER, J. C.; SHIH, C.; EHRHARDT, D.; GROSSMAN, A. R.; APT, K. E. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. **Science**, v. 292, p. 2073-2075, 2001.

ZENG, X.; DANQUAH, M.K.; CHEN, X.D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. **Renew Sustain Energy Rev**, v.15, p. 3252–3260, 2011.

ZIOLKOWSKA, J. R.; SIMON, L. Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. **Renew Sustain Energy** , v. 29, p. 847–853, 2014.

ZHU, J.; RONG, J.; ZONG, B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chin J Catal**, v. 34, p.80–100, 2013.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renew. Sustain. Energy Rev**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

ZHU, L. Biorefinery as a Promising Approach to Promote Microalgae Industry: An Innovative Framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376–84. 2015.

ZIOLKOWSKA, J. R.; SIMON, L. Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 29, p.847–53, 2014.

6 APÊNDICE (A) - MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Segundo Montgomery 2001), o método de superfície de resposta é uma ferramenta utilizada para modelar e analisar a variável resposta de interesse, a fim de melhorar o objetivo em estudo (MONTGOMERY, 2001).

O MSR é uma técnica de otimização que apresenta planejamentos experimentais fatoriais, e que é muito usada na modelagem de processos industriais. Este método consiste em duas etapas; modelagem e deslocamento; que têm por finalidade atingir a região ótima (máxima ou mínima) da área estudada (BRUNS; NETO; SCARMÍNIO, 2010).

As etapas descritas, como por exemplo: a modelagem e o deslocamento consistem em analisar o comportamento das variáveis entrada como variáveis de decisão em relação a variável resposta. As variáveis apresentam correlações, sendo assim, são obtidas por modelos de segunda ordem através do método dos mínimos quadrados (Equação A-1), no qual Y é a variável resposta, β_0 é a constante e β_i, β_{ii} e β_{ij} são respectivamente, os coeficientes linear, quadrático e o de interação dos efeitos (MONTGOMERY, 2001).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{i \neq j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{A-1})$$

O Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (OLS – *Ordinary Least Squares*) de acordo Montgomery (2001), permite determinar β_i , minimizando a soma dos quadrados dos erros.

$$L = \sum_{i=0}^n \varepsilon_i^2$$

$$= \sum_{i=1}^n \left(y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^k \beta_j x_{ji} \right)^2$$

A função L deve ser minimizada em função de $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_k$, e em seguida igualada a zero.

$$\frac{\partial L}{\partial \hat{\beta}_j} = -2 \sum_{i=1}^n \left(y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^k \hat{\beta}_j x_{ij} \right)$$

Simplificando, tem-se:

$$\hat{\beta}_0 \sum_{i=1}^n x_{ik} + \hat{\beta}_1 \sum_{i=1}^n x_{ik} x_{i1} + \hat{\beta}_2 \sum_{i=1}^n x_{ik} x_{i2} + \dots + \hat{\beta}_k \sum_{i=1}^n x_{ik}^2 = \sum_{i=1}^n x_{ik} y_i$$

Em notação matricial, tem-se $Y = \beta X + \varepsilon$, onde:

$$y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}, X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{11} & \cdots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{bmatrix}, \beta = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix} \text{ e } \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}$$

Então:

$$L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \varepsilon^T \varepsilon = (y - X\beta)^T (y - X\beta)$$

$$L = y^T y - \beta^T X^T y - y^T X \beta + \beta^T X^T X \beta$$

$$L = y^T y - 2\beta^T X^T y + \beta^T X^T X \beta$$

Minimizando a função:

$$\frac{\partial L}{\partial \beta} = -2X^T y + 2X^T X \hat{\beta} = 0$$

Portanto,

$$X^T X \hat{\beta} = X^T y \text{ e } \hat{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T y.$$

O planejamento de superfície de resposta pode ser ampliado, sendo assim formar o planejamento estrela (SILVA, 2007). Essa etapa significa que o processo atingiu o ponto de melhoria, ou seja, o modelo em estudo se caracteriza pelo quadrático (BRUNS; NETO; SCARMINIO, 2010).

O método e superfície de resposta vem sendo empregados nas mais diversas áreas de pesquisa com a finalidade de otimizar parâmetros experimentais em busca da melhoria da qualidade dos produtos ou processos de fabricação, aumentando a produtividade e reduzindo o tempo de desenvolvimento de produtos. Entre as áreas do conhecimento em que é possível encontrar aplicações dessa metodologia pode-se citar: Engenharia química, Meio Ambiente bioprocessos, engenharia de remediação entre outras.

LOURES et al. (2014) aplicaram a metodologia de superfície de resposta no estudo do tratamento de efluentes de lácteos via processo oxidativo foto-Fenton visando a redução da carga orgânica. A condição otimizada alcançou uma eficiência máxima na redução da carga orgânica atingindo percentuais de 81%, 90,7%, e 78,8%, para DOC, COD e BOD respectivamente.

SAMANAMUD et al. (2013) aplicaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar o processo fotocatalítico empregado no estudo do tratamento de efluentes lácteos via processo de oxidação avançada (POA) utilizando o ZnO imobilizado e / UV solar como uma fonte energia para degradar a matéria orgânica presente no efluentes em estudo. Os resultados otimizados mostrou uma degradação de TOC de 31,7%.

Li et al., (2011) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção de biomassa de microalga *C. minutissima* UTEX2341. O método mostrou-se eficiente, demonstrando um aumento na produtividade de biomassa e na a produtividade lipídica quando comparado com outros autores.

PATIL et al. (2011) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para desenvolver e otimizar a liquefação direta e conversão de biomassa microalgal úmida em biodiesel sob condições supercríticas utilizando metanol. A condição otimizada permitiu a extração e transesterificação simultâneas da biomassa microalgal úmida prevenindo a

formação de subprodutos, conferindo eficiência energética e apresentando-se como uma rota econômica para a produção de biodiesel microalgal.

GONÇALVES E STURARO (2010) utilizaram a metodologia de superfície de resposta na redução da concentração de cobre presente em solo arenoso de áreas contaminadas. O método apontou combinações de concentração de Na₂ EDTA, volume e pH da solução extratora que permitem reduzir a concentração de cobre a valores inferiores aos dispostos pela agência ambiental paulista.

Método de superfície de Resposta

Para a melhor condição, realizou-se um fatorial 2² com triplicata no ponto central para os fatores mais influentes (CO₂, Temperatura) conforme Quadro 6-1

Quadro 6-1 Método de Superfície de Resposta para o processo de cultivo da *microalga* *C. minutissima*. Parâmetros e níveis do Planejamento fatorial 2² para otimização das variáveis mais influentes.

Experimento	CO ₂	Temperatura
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	- (2) ^{1/2}	0
9	0	(2) ^{1/2}
10	(2) ^{1/2}	0
11	0	- (2) ^{1/2}

Após determinar a melhor condição conforme função desirability, utilizou-se de um fatorial completo 2² tomando os dois fatores mais influentes do processo (CO₂,

Temperatura), foi possível construir a Superfície de Reposta representada onde os efeitos bem como os coeficientes para os fatores em questão tanto para a biomassa quanto para o óleo, podem ser visualizados nas Figuras 4.7 e 4.8 respectivamente.

Para a concentração de biomassa, nenhum dos parâmetros são significativos, sendo o menos insignificante o termo linear de temperatura (L), para a concentração de lipídeos os termos também são pouco significativos, dessa forma impossibilita a criação da superfície de contorno obtida por meio dos parâmetros estimados. Caso fosse realizada uma análise desprezando-se esse fato, os valores máximos de concentração celular ocorrem com as temperaturas no limite inferior e a concentração máxima de lipídeos ocorre para valores de CO₂ no valor máximo e temperatura no valor mínimo. O que poderia sugerir que a condição de CO₂ no limite máximo e a temperatura no limite mínimo como sendo as melhores condições. Porém, devido à falta de confiabilidade demonstrada nas ANOVAs representadas pelos Quadro 6-2 e Quadro 6-3, acredita-se que não seja possível realizar considerações relevantes com as superfícies de resposta apresentadas nas

Figura 6-1 e Figura 6-2. Observou-se que para os fatores CO₂ e temperatura, o valor de $P_{crítico}$ fornecido pela ANOVA em termos de curvatura, foi de 0,9297 para a concentração microalgal e 0,8367 para o teor lipídico.

Quadro 6-2 Análise da variância (ANOVA) para biomassa reator 44L

Fator	SS	DF	Ms	F	P
1-					
Temperatura(L)	0,006996	1	0,006996	6,000938	0,057959
Temperatura(Q)	0,002171	1	0,002171	1,862316	0,230564
2- CO2 (L)	0,000496	1	0,000496	0,425354	0,543066
CO2 (Q)	0,000849	1	0,000849	0,728146	0,432452
1L by 2L	0,000010	1	0,000010	0,008601	0,929709
Error	0,005829	5	0,001166		
Total SS	0,015763	10			

Quadro 6-3 Análise da variância (ANOVA) para Óleo reator 44L

Fator	SS	DF	Ms	F	P
1-Temperatura(L)	9,5107	1	9,51072	0,496146	0,512643
Temperatura(Q)	0,9188	1	0,91877	0,047930	0,835362
2- CO2 (L)	16,0632	1	16,06322	0,837971	0,401969
CO2 (Q)	0,6739	1	0,67390	0,035155	0,858642
1L by 2L	0,9025	1	0,90250	0,047081	0,836799
Error	95,8459	5	19,16918		
Total SS	123,5591	10			

Figura 6-1 Superfície de Resposta para concentração celular (Biomassa)

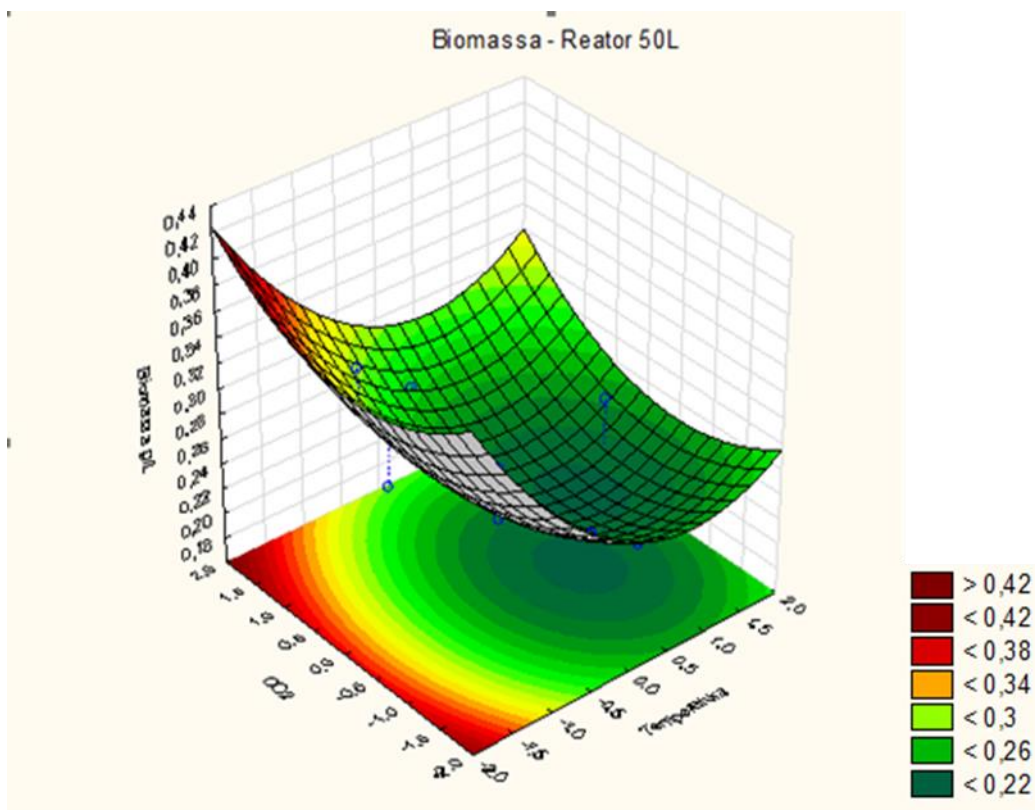


Figura 6-2 Superfície de Resposta para teor de lipídeo (Óleo)

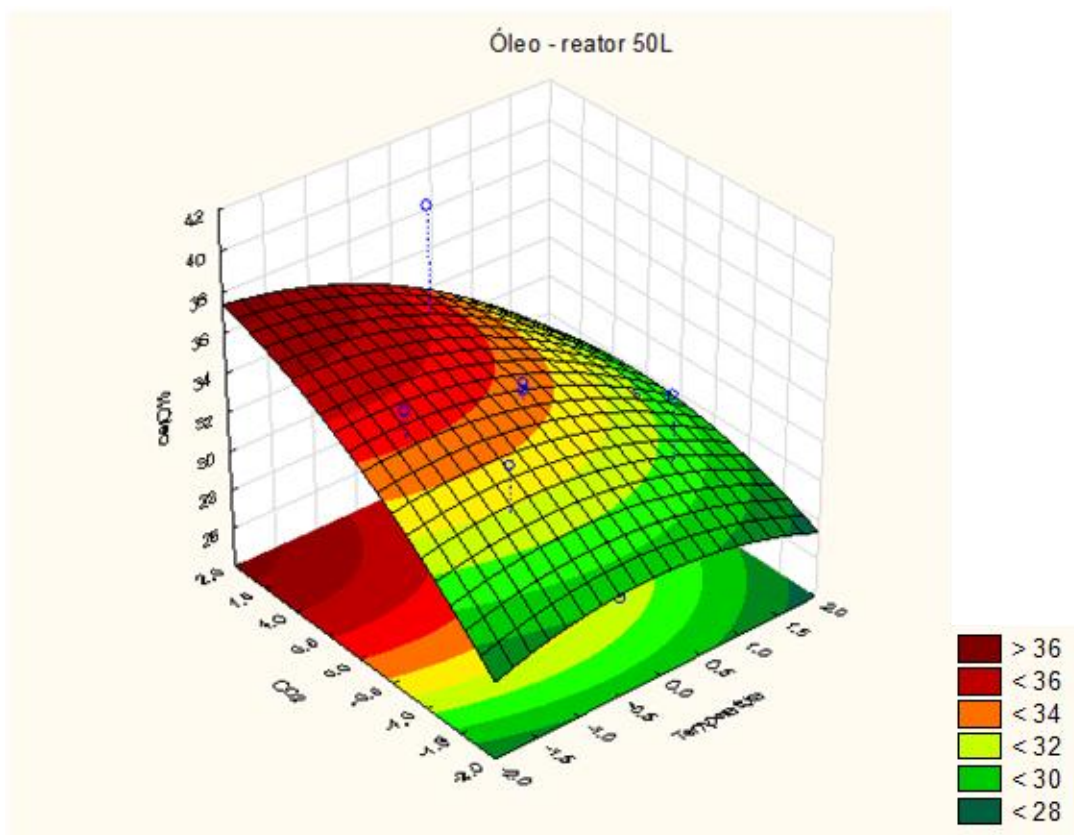


Figura 6-3 Superfície de Resposta para Biomassa e teor lipídios para reator 18L.

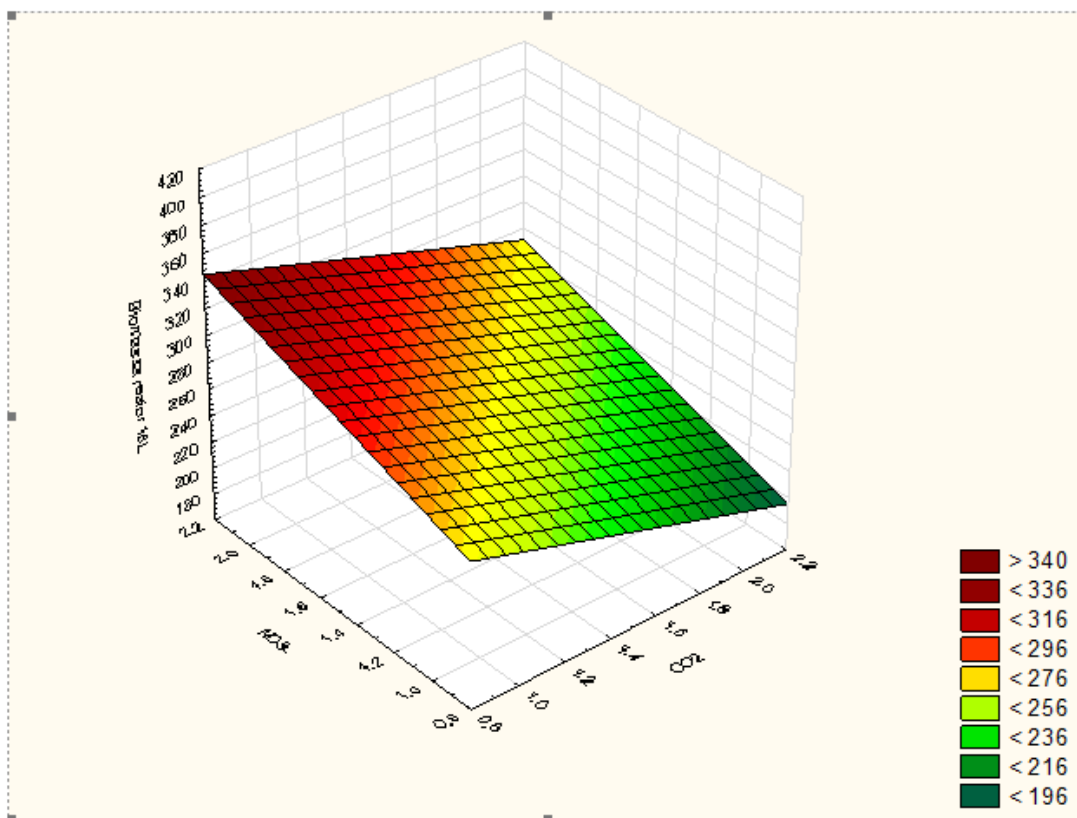
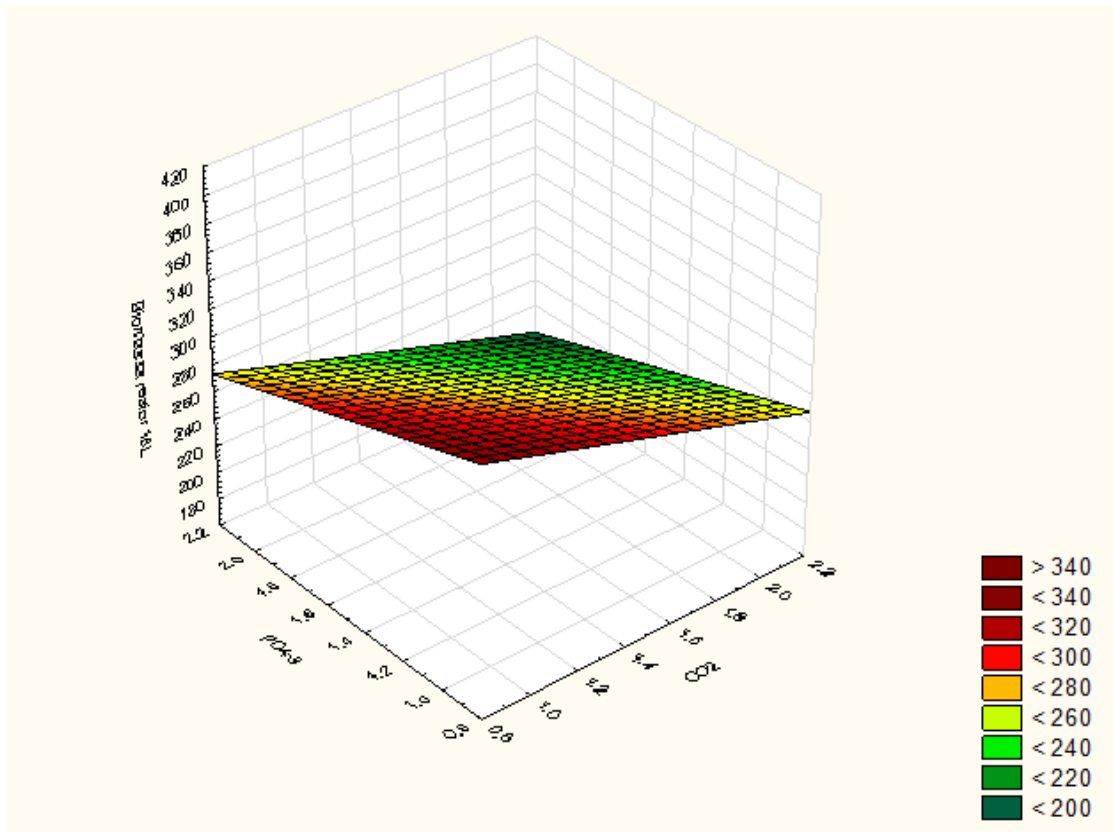


Figura 6-4



7 APÊNDICE (B) - COEFICIENTES PARA O MODELO LINEAR

Figura 7-1 Coeficientes do modelo matemático referente a média (Biomassa) reator de 18L

Coeficientes de Modelo Estimados para Médias

Termo	Coef	EP de Coef	T	P
Constante	0,270208	0,03362	8,036	0,079
CO2 1	0,026458	0,03362	0,787	0,576
NO3- 1	-0,026958	0,03362	-0,802	0,570
PO4+ 1	0,024292	0,03362	0,722	0,602
Suplemen 1	0,008958	0,03362	0,266	0,834
Temperat 1	0,030208	0,03362	0,898	0,534
Salinida 1	-0,004875	0,03362	-0,145	0,908

S = 0,09511 R2 = 72,8% R2(aj.) = 0,0%

Figura 7-2 Coeficientes do modelo matemático referente a média (Biomassa) reator de 44L

Coeficientes de Modelo Estimados para Médias

Termo	Coef	EP de Coef	T	P
Constante	0,255708	0,02821	9,065	0,070
CO2 1	0,018125	0,02821	0,643	0,636
NO3- 1	-0,002292	0,02821	-0,081	0,948
PO4+ 1	0,017625	0,02821	0,625	0,644
Suplemen 1	0,003875	0,02821	0,137	0,913
Temperat 1	0,036792	0,02821	1,304	0,416
Salinida 1	0,003375	0,02821	0,120	0,924

S = 0,07979 R2 = 71,8% R2(aj.) = 0,0%

Figura 7-3 Coeficientes do modelo matemático referente a média (% lipídios) reator de 18L

Coeficientes de Modelo Estimados para Médias

Termo	Coef	EP de Coef	T	P
Constante	33,3350	1,273	26,179	0,024
CO2 1	-3,0250	1,273	-2,376	0,254
NO3- 1	0,4058	1,273	0,319	0,804
PO4+ 1	-0,8542	1,273	-0,671	0,624
Suplemen 1	6,1675	1,273	4,844	0,130
Temperat 1	0,7408	1,273	0,582	0,665
Salinida 1	-1,1800	1,273	-0,927	0,524

S = 3,602 R2 = 96,9% R2(aj.) = 78,0%

Figura 7-4 Coeficientes do modelo matemático referente a média (% lipídios) reator de 44L

Coeficientes de Modelo Estimados para Médias

Termo	Coef	EP de		T	P
		Coef			
Constante	31,3108	2,741	11,424	0,056	
CO2 1	-0,8058	2,741	-0,294	0,818	
NO3- 1	-1,8900	2,741	-0,690	0,616	
PO4+ 1	0,2033	2,741	0,074	0,953	
Suplemen 1	1,4150	2,741	0,516	0,697	
Temperat 1	0,3967	2,741	0,145	0,909	
Salinida 1	0,8925	2,741	0,326	0,800	
S = 7,752 R2 = 49,0% R2 (aj.) = 0,0%					