

**GISELY SOUZA CAMPOS MORAES**

**Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir  
da microalga *Chlorella Vulgaris***

**Gisely Souza Campos Moraes**

**Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir  
da microalga *Chlorella Vulgaris***

Dissertação apresentada à faculdade de Engenharia do Campus Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, para obtenção, do título de Mestre em Engenharia de Produção.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marcela Aparecida Guerreiro Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

M827p Moraes, Gisely Souza Campos  
Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir da microalga  
chlorella vulgaris / Gisely Souza Campos Moraes – Guaratinguetá, 2018.  
70 f : il.  
Bibliografia: f. 64-69

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Engenharia de Guaratinguetá, 2018.  
Orientador: Prof. Dr. Mrcela Aparecida Guerreiro Machado  
Coorientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva

1. Biomassa 2. Microalga 3. Planejamento experimental I. Título.

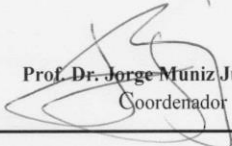
CDU 620.91(043)

*GISELY SOUZA CAMPOS MORAES*

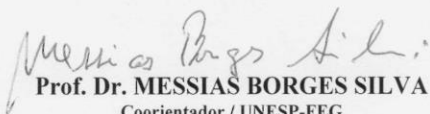
ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
“MESTRE EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO”

PROGRAMA: ENGENHARIA DE PRODUÇÃO  
CURSO: Mestrado Profissional

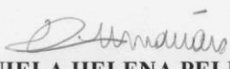
APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

  
Prof. Dr. Jorge Müniz Junior  
Coordenador

**BANCA EXAMINADORA:**

  
Prof. Dr. MESSIAS BORGES SILVA  
Coorientador / UNESP-FEG

  
Prof. Dr. ANEIRSON FRANCISCO DA SILVA  
UNESP-FEG

  
Prof. Dr. DANIELA HELENA PELEGRINE GUIMARÃES  
EEL/USP

Dezembro de 2018

## **DADOS CURRICULARES**

### **GISELY SOUZA CAMPOS MORAES**

**NASCIMENTO** 16.11.1986 – Capanema – Pará – Brasil

**FILIAÇÃO** Gregório Bispo Campos  
Nilza Souza Campos

2008/2012 Tecnologia Agroindustrial- Alimentos  
Universidade do estado do Pará

2015/2016 Curso de Pós-Graduação/ Lato Senso  
Vigilância Sanitária e qualidade de alimentos  
Universidade Estácio de Sá

Dedico este trabalho a Deus,  
por ser essencial em minha vida,  
aos meus pais e ao meu esposo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por essa vitória, pois sem ele não conseguiria.

Aos meus pais, que sempre me ensinaram a valorizar os estudos, e me conduziram em bons estudos e ensinamentos que proporcionaram na formação do meu caráter. A minha irmã maravilhosa que sempre esteve presente a pesar da distância.

Ao meu esposo pelo carinho, compreensão e sempre me apoio, que esteve comigo no laboratório até nos feriados e fim de semana.

Ao meu orientador Prof. Dr. Messias pelas orientações, compreensão e minha orientadora Prf<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcela.

A equipe maravilhosa do laboratório de microalgas da USP. Em especial, Mateus, Guilherme, Saviene e Victor. Amiga Carla pelos sábios conselhos.

Ao Instituto Federal de Roraima pela oportunidade de realizar esse mestrado, as gestões de ensino e pesquisa.

Ao IFRR pela oportunidade de realizar o mestrado profissional em parceria com Unesp.

Aos meus alunos de IC Nívea, Lucas, Guilherme, Ana Beatriz, Dannye e Andreina.

As amigas e aos amigos do IFRR, Edilacy, Marlúcia, Conceição, Paulo, Guilherme.

“Não temas, por que eu sou contigo; não te assombres,  
por que sou teu Deus; eu te fortaleço e te ajudo”.

Isaías 41:10.



## RESUMO

A microalga *Chlorella* possui ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e alto conteúdo proteico. Desse modo, estudos recentes têm explorado o uso de microalgas para obtenção de lipídios, principalmente os de maior valor comercial como o ácido  $\gamma$ -linolênico. Este trabalho objetivou propor um método de cultivo para a microalga *Chlorella vulgaris* e extração do óleo. Os experimentos foram realizados em duplicata de acordo com o arranjo ortogonal de Taguchi, a partir da qual foram organizadas duas etapas: na primeira foram viabilizados cultivos nos quais os fatores de interesse pudessem ser avaliados em dois níveis de operação: Aeração (1,67 e 3,33L/min),  $\text{NO}_3$  (0,25 e 0,50 g/L),  $\text{PO}_4^{-3}$ (0,35 e 0,65 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (0,25 e 0,50 g/L), intensidade de luz (0,85 e 14,50 K luz) e fotoperíodo (12 e 24 h). Em tal etapa correu também a colheita, flocculação, secagem e moagem da biomassa. Na segunda etapa foram realizadas as extrações lipídicas de acordo com o uso de solventes como o clorofórmio e metanol, utilizou-se também o banho de ultrassom para as extrações dos teores lipídicos. Obteve melhor resultado a concentração de biomassa algal, a qual atingiu a concentração de nitrato (0,50 g/L), concentração de bicarbonato de sódio (0,50 g/L), fosfato (0,65 g/L) e fotoperíodo de 12 em 12hs. O melhor resultado para a extração lipídica ocorreu conforme a metodologia de Zorn (2017), com aproximadamente 2,5% mais eficiente e obteve o seguinte resultado para os fatores, no nível alto são: aeração (3,33 L/min), nitrato (0,50g/L) e bicarbonato de sódio (0,50 g/L) e os seguintes fatores que se apresentou no nível baixo são: fosfato (0,35g/L), intensidade luminosa (0,85 k luz) e fotoperíodo (12 e 12). Com base no perfil de ácido graxo foi identificada a proporção dos ácidos graxos (27,72%) do palmítico; (7,34%) do oleico; (18,57%) do ácido linoleico e (16,41%) do ácido linolênico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microalga. *Chlorella vulgaris*. extração lipídica. Planejamento de experimentos Taguchi.

## ABSTRACT

The micro-algae *Chlorella* has polyunsaturated fatty acids, vitamins and high protein content. Thus, recent studies have explored the use of microalgae to obtain lipids, especially those with higher commercial value such as  $\beta$ -linolenic acid. The objective of this work was to propose a method of cultivation for the microalga *Chlorella vulgaris* and extraction of the oil. The experiments were carried out in duplicate according to Taguchi's orthogonal arrangement, from which two stages were organized: in the first, cultures were feasible in which the factors of interest could be evaluated at two levels of operation: aeration (1.67 e 3.33L/min),  $\text{PO}_4^{-3}$  (0.35 and 0.65 g / L),  $\text{NaHCO}_3$  (0.25 and 0.50 g / L),  $\text{NO}_3$  (0.25 and 0.50 g / L) , light intensity (0.85 and 14.50 K light) and photoperiod (12 and 24 h). In this stage also the harvest, flocculation, drying and milling of the biomass took place. In the second stage, the lipid extractions were performed according to the use of solvents such as chloroform and methanol, and the ultrasonic bath was used to extract the lipid contents. The best results were the algal biomass concentration, which reached the concentration of nitrate (0.50 g / L), sodium bicarbonate (0.50 g / L), phosphate (0.65 g / L) and photoperiod every 12 hours. The best result for the lipid extraction occurred according to the Zorn (2017) methodology, with approximately 2.5% more efficient and obtained the following result for the factors, at the high level are: aeration (3.33 L / min), nitrate (0.50 g / L) and sodium bicarbonate (0.50 g / L) and phosphate (0.35 g / L), light intensity (0.85 k photoperiod 12 and 12). Based on the fatty acid profile, the proportion of fatty acids (27.72%) of palmitic acid was identified; (7.34%) of the oleic; (18.57%) of linoleic acid and (16.41%) of linolenic acid.

**KEYWORDS:** Microalgae. *Chlorella vulgaris*. lipid extraction . Planning of Taguchi experiments.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Publicações por ano.....	21
Figura 2 - Publicações por autor.....	21
Figura 3 - Microalga <i>Chlorella Vulgares</i> , alga da água doce.....	24
Figura 4 - Sistema de cultivo aberto em tanque ( <i>raceway</i> ) .....	28
Figura 5 - Sistema fechado de cultivo .....	29
Figura 6 - Etapas de obtenção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas .....	31
Figura 7 - Transesterificação de óleo para biodiesel .....	32
Figura 8 - Classificação da Pesquisa .....	35
Figura 9 - Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa .....	36
Figura 10 - Desenho esquemático do Cepário .....	38
Figura 11- Sistema de fotobiorreatores: Laboratório de Química do IFRR .....	39
Figura 12 - Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa .....	40
Figura 13 - (A) Biomassa floculada; (B) Filtração da biomassa a vácuo; (C) Biomassa filtrada .....	41
Figura 14 - (A) Banho-maria com agitação; (B) Filtração e separação de fases .....	42
Figura 15 - Amostras em agitação via banho de ultrassom .....	43
Figura 16 - Fluxograma que ilustra o esquema das etapas realizadas durante a execução do trabalho .....	46
Figura 17 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 01 .....	47
Figura 18 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 02 .....	48
Figura 19 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 03 .....	48
Figura 20 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 04 .....	49
Figura 21- Curva de crescimento celular microalgal do experimento 05 .....	49
Figura 22- Curva de crescimento celular microalgal do experimento 06 .....	50
Figura 23 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 07.....	50
Figura 24 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento .....	51
Figura 25 - Efeito dos fatores a variável resposta concentração de biomassa.....	53
Figura 26 - Efeito dos fatores a variável resposta de produtividade .....	54
Figura 27 - Efeito dos fatores a variável resposta concentração de lipídeo .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação de microalgas com outras matérias-primas de biodiesel.....	27
Tabela 2 - Reagentes utilizados para a preparação do meio de cultivo .....	37
Tabela 3 - Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> , fatores da matriz L8 de Taguchi .....	43
Tabela 4 - Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L8.....	44
Tabela 5 - Resultados obtidos para concentração celular (Biomassa) .....	52
Tabela 6 - Análise de variância para Biomassa .....	54
Tabela 7 - Resultados obtidos para produtividade .....	54
Tabela 8- Análise de variância para produtividade .....	57
Tabela 9 - Respostas em duplicata para teor de lipídeo (%)......	58
Tabela 10 - Análise de variância para teor de lipídeos .....	60

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultados de buscas na base de dados Scopus .....	20
Quadro 2- Conteúdo de óleo de microalgas .....	23
Quadro 3- Composição dos ácidos graxos da biomassa da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> e comparação com outros autores.....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação entre os métodos.....	59
--	----

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIMBOLOS

PUFA	(Ácidos graxos poli-insaturados)
EPA	( Ácido eicosapentaenoico)
DHA	( Ácido docosahexaenóico)
ANOVA	(Análise da variância)
DOE	(Design of Experiment )
CO <sub>2</sub>	(Dióxido de carbono)
<i>C. Vulgaris</i>	( <i>Chlorella Vulgaris</i> )
NaNO <sub>3</sub>	( Nitrato de sódio)
NO <sub>3</sub>	(Nitrato)
NaHCO <sub>3</sub>	(Bicarbonato de sódio)
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	(Fosfato)
BBM	( Meio Bold Basal)
[ ]	(Concentração)
Ms	(Massa seca )
V	(volume)
MFL	( massa final de lipídeos )
P	(produtividade)
%L	( teor de lipídeo)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	16
1.2	QUESTÃO DA PESQUISA E OBJETIVOS.....	18
1.3	JUSTIFICATIVA.....	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>23</b>
2.1	CLASSIFICAÇÃO DAS MICROALVAS.....	23
2.2	CHLORELLA VULGARIS.....	24
2.3	MICROALGAS, SEUS DIVERSOS PRODUTOS E APLICAÇÕES.....	25
2.4	POTENCIALIDADE DAS MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	26
2.5	CULTIVO DAS MICROALGAS.....	27
<b>2.5.1</b>	<b>Raceway.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Fotobiorreator.....</b>	<b>28</b>
2.6	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	29
<b>2.6.1</b>	<b>Método Bligh e Dyer.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Método Folch.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Método de extração Soxhlet.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Método extração com fluido supercrítico.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.5</b>	<b>Método de extração por ultrassom.....</b>	<b>30</b>
2.7	OBTENÇÃO DO BIODIESEL.....	30
2.8	VIABILIDADE ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL DE MICROALGAS.....	32
2.9	MÉTODO DE TAGUCHI.....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>35</b>
3.1	LINHAGEM DA MICROALGA.....	36
<b>3.1.1</b>	<b>Reagentes.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Preparo dos materiais.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Cepário .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Fotobiorreator .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Acompanhamento dos cultivos .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Colheita, floculação da biomassa e filtração .....</b>	<b>40</b>



<b>3.1.7</b>	<b>Determinação dos lipídeos método Bligh e Dyer .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.8</b>	<b>Determinação de lipídeos método Zorn.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1</b>	<b>O Método de Taguchi (arranjo ortogonal L8).....</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>METODOLOGIA ANALÍTICA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Concentração de biomassa.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Teor de lipídeo.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Produtividade de biomassa.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Análise do perfil de ácidos graxo.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DOS CULTIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>EFEITO DOS FATORES SOBRE A MÉDIA DA VARIÁVEL RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>EFEITO DOS FATORES SOBRE A PRODUTIVIDADE DA BIOMASSA MICROALGAL.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4</b>	<b>TEOR DE LIPÍDEOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXO.....</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNCIDE - FLUXOGRAMA DE ETAPAS DESENVOLVIDAS NA PESQUISA.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A diminuição das reservas petrolíferas e a elevação do custo para sua obtenção, aliadas à crescente preocupação com a preservação ambiental vêm exigindo soluções tecnológicas imediatas diante das necessidades de consumo. A partir desse princípio, é comprovada a tendência de crescimento nas pesquisas de desenvolvimento de energia e materiais produzidos a partir de fontes renováveis (COSTA, 2015).

Nesse contexto, o trabalho propôs o estudo do cultivo de microalgas sob condições controladas visando a produção de biomassa, bem como a sua porcentagem em lipídios, a partir da técnica de Planejamento de Experimentos, o Método de Taguchi.

### 1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com microalgas quanto à sua utilização como alimento na agricultura, no tratamento de águas residuais, na produção de diversos compostos com alto valor agregado, como corantes e ácidos graxos, e também para biofixar CO<sub>2</sub> da atmosfera (MORAIS, 2008).

A microalga *Chlorella* possui ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e alto conteúdo proteico. Por isso, recentemente estudos veem sendo implementados com o uso de microalgas para obtenção de lipídios, principalmente o ácido  $\gamma$ -linolênico pois possui valor comercial (COSTA, 2006).

As microalgas podem apresentar de 1 a 40% de lipídios e, em determinadas condições de cultivo, pode alcançar 85%. Alguns fatores podem influenciar na produção de lipídios e ácidos graxos por microalgas, como intensidade luminosa, temperatura e nutrientes (MORAIS, 2008).

Os ácidos graxos extraídos de microalgas podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis. Os principais ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são o ácido linoléico, ácido linolênico, araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (ANTONIO, 2014).

A biomassa microalgal apresenta, quando comparada com outras fontes de ácidos graxos, ausência de contaminação, bem como certas microalgas possuem significativamente maior espectro de PUFA, alguns com cadeias com mais de 18 átomos de carbono (ILLMAN, 2000).

Nesse cenário, surgem as microalgas, fonte promissora de energia renovável, capazes de fornecer diversos produtos e substâncias importantes em diferentes campos tecnológicos e aplicações. No ramo energético, por exemplo, podem fornecer matéria-prima para gerar biocombustível, como biodiesel, bio-óleo, biogás (metano e hidrogênio) e bioetanol (ZORN, 2017).

As matérias-primas tradicionais são utilizadas para a produção de biodiesel de origem agrícola como, por exemplo, colza, girassol, soja ou palma. A tecnologia de conversão destas matérias-primas está completamente desenvolvida e aplicada no mercado. No entanto, as culturas mencionadas levantam sérios problemas ao nível da sustentabilidade ambiental, dado que necessitam de imensas áreas, fertilizantes químicos e pesticidas, assim como problemas na competição entre o setor alimentício e energético (GAIVÃO, 2013; AMARAL et al, 2016). Devido aos custos e grandes impactos ambientais que a matéria-prima tradicional vem causando ao meio ambiente, alternativas para a produção de energia tem sido cada vez estudada.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com microalgas, em relação à sua utilização na obtenção de diversos compostos com alto valor agregado, como os ácidos graxos e a biofixação de gás carbônico (CHRISTI, 2013).

As microalgas, que são organismos microscópicos fotossintéticos encontrados em ambientes marinhos e de água doce, têm se destacado perante aos outros microrganismos que fazem parte dessa classe, em razão do seu potencial de acúmulo de material lipídico, sendo que os principais componentes da fração lipídica são os triglicerídeos e ácidos graxos livres que podem ser convertidos em biodiesel, além de apresentar elevada taxa de crescimento e maior eficiência fotossintética (LOURES, 2016).

São evidenciadas as vantagens, segundo alguns autores, da utilização das microalgas como fontes lipídicas para a síntese de biodiesel, como: o cultivo de microalgas consome menos água que o cultivo terrestre, a alta taxa de crescimento das microalgas torna possível para satisfazer a demanda maciça de biocombustíveis utilizando espaços limitados, seus subprodutos podem ser usado como adubo ou para a produção de outros produtos de alta energia, a liberação de óxido nitroso pode ser minimizada quando microalgas são utilizados para a produção de biocombustíveis (CHRISTI, 2013; LI et al 2008; AHMAD et al, 2011).

Diante do contexto em evidência, as microalgas apresentam um alto potencial energético, mas para que se tornem viáveis economicamente como fonte de energia e biocombustíveis há a necessidade de vencer uma série de desafios. É preciso ponderar que o

biodiesel proveniente de microalgas ainda se encontra em escala laboratorial, pois, apesar de ser ambientalmente sustentável, ainda é um combustível caro para a comercialização em larga escala. Nesse sentido, em comparação ao proveniente do petróleo, a comercialização em larga escala desse combustível ainda é sombria, porém quanto à comercialização a médio prazo seria adequado para aplicações de nichos, por exemplo: o setor de aviação (CHISTI, 2013; LOURES, 2016).

## 1.2 QUESTÃO DA PESQUISA E OBJETIVO

Com base no cenário abordado, determinou-se a questão de pesquisa que motivou o trabalho: quais os fatores possuem níveis ótimos que potencializam o teor de lipídeos em função do perfil de ácido graxos?

O objetivo geral: propor um método de cultivo para a microalga *Chlorella vulgaris* e extração do óleo.

Para tanto, foram vislumbrados também os seguintes objetivos específicos:

- Utilizar o Método de Taguchi e ANOVA para propor o cultivo;
- Determinar o teor de lipídeos em condições experimentais;
- Evidenciar o perfil de ácido graxo do material lipídico.

## 1.3 JUSTIFICATIVA

Os microrganismos fotossintéticos como as microalgas presentes nos ambientes aquáticos são responsáveis pela produção de O<sub>2</sub> e fixação de CO<sub>2</sub>. A biomassa produzida da assimilação de CO<sub>2</sub> pode ser transformada em alimento humano, ração animal, bem como os ácidos graxos extraídos da biomassa podem ser convertidos em biocombustíveis, alimentos e fármacos (LOURES, 2016).

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

Mesmo que exista a discussão acerca da prevalência de uma nova fonte de biocombustíveis, os relatos vigentes no Brasil estão restritos a algumas instituições de pesquisa como as universidades ou algumas empresas do setor privado, as quais realizam seus

estudos em escala laboratorial no sentido de contribuir de forma significativa com a tentativa de ampliação das escalas dos projetos, assim como minimizar os custos de produção desta fonte alternativa de energia, pois tal tecnologia demanda custos elevados. Assim, são utilizados modelos matemáticos para aperfeiçoamento, tais como, desing de experimentos (DOE) e análise de variância, para obter o comportamento do processo em níveis de confiança (ANTONY, 2006; LOURES, 2016).

Tansel (2011) salienta que o método Taguchi é aplicado nos processos como uma das mais importantes ferramentas do planejamento de experimentos. Para Loures (2016), o Taguchi permite a análise de um processo com muitas variáveis de entrada e um número reduzido de experimentos.

A Análise de variância (ANOVA) é um método estatístico complementar ao planejamento de experimentos, utilizado para interpretar os dados experimentais nas tomadas de decisões e testar estatisticamente as médias dos resultados em suas diferentes condições. 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 (MONTGOMERY, 2012).

Determinados autores em seus trabalhos de pesquisa utilizam o método Taguchi para obter melhores resultados. Loures (2016) utilizou esse método, Matriz  $L_8$  em cultivo de *Chlorella sp.* para determinar os fatores  $CO_2$  (0 e 2%),  $NO_3^-$  (0,25 e 0,50 g/L),  $PO_4^-$  (0,35 e 0,65 g/L), suplementação do cultivo (1 e 2 ml), temperatura (20 e 30 °C), salinidade (15 e 30 g/L). De acordo com o método Taguchi, o experimento que alcançou melhor resultado para o teor de lipídeos extraído da alga foi proveniente da concentração mais alta de  $NaNO_3$  (50 g  $L^{-1}$ ), quando o meio foi suplementado com 2% de  $CO_2$  (experimento 2) e a temperatura mantida a 30°C. Já 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.

Zorn (2017) utilizou o método de Taguchi para desenvolver o melhor processo exploratório de extração de óleo de microalgas marinhas, os fatores estudados foram: umidade de biomassa (%), proporção de solventes (clorofórmio/metanol/água) (v/v/v), volume total de solventes (mL) e tempo de ultrassom (min). Observou-se como melhor resposta o experimento com o teor mais elevado de lipídios, em média de 19,8%, quando se empregou biomassa com 64% de umidade, a proporção de solventes de 5,7: 3: 1 (v/v/v), o volume total de solventes de 33,0 mL e o tempo total de ultrassom de 90 minutos, conclui-se que a

extração realizada com biomassa úmida resultou em melhores rendimentos que com a biomassa desidratada, significando economia de energia durante o processo.

Amaral (2014) escolheu o método de Taguchi para determinar o melhor cultivo da microalga marinha *Chlorella sp.* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel a partir dos seguintes fatores exploratórios Intensidade de Luz (0,85 e 14,5 klux), CO<sub>2</sub> (5 e 10%), NaNO<sub>3</sub> (0,25 e 0,75 g/L), profundidade (5 e 10 cm). O método Taguchi obteve como resposta o melhor experimento para concentração de biomassa microalgal, com concentração mais elevada de NaNO<sub>3</sub>. Para os níveis de interação entre fatores, obteve-se o melhor resultado para a interação de Intensidade luminosa e profundidade para os níveis mais elevados entre os fatores.

Observa-se que o método de Taguchi se trata de uma ferramenta apropriada para atingir resultados com mais de um fator, assim podendo determinar os melhores níveis que poderão ser usados nas pesquisas exploratórias.

Com isso, foi realizada uma pesquisa na base de dados Scopus relacionada com palavras-chave em inglês, no período de 2008 a 2018, apresentando as seguintes áreas de limitação Chemical Engineering, Chemistry, Energy e Engineering. Como resultado da pesquisa, pode ser observado no Quadro 1. Utilizou-se delimitações ao longo das pesquisas para evitar generalizações relacionados ao tema, assim permitiu o alcance de artigos mais relevantes.

Quadro 1 – Resultados de buscas na base de dados Scopus

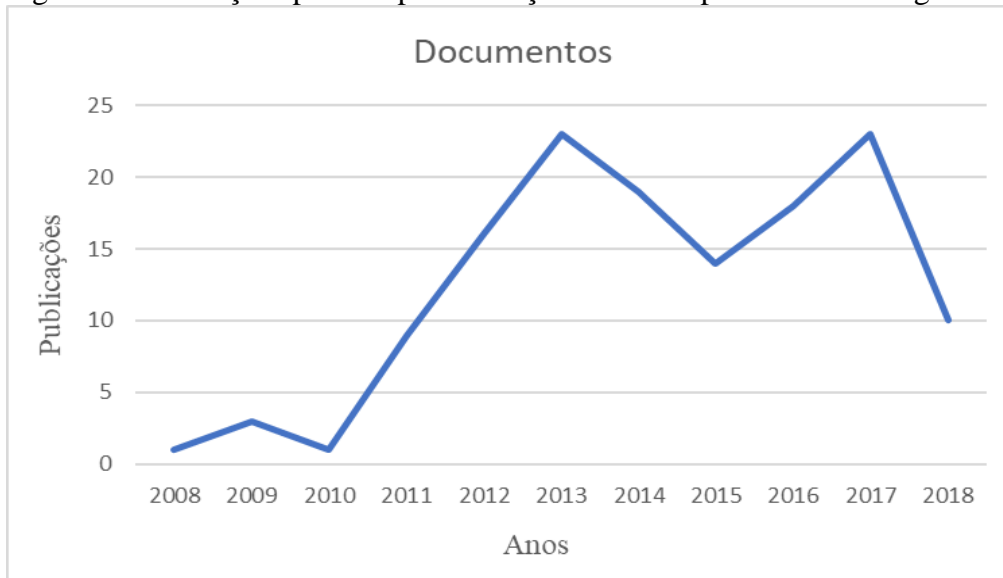
<b>PALAVRAS- CHAVE</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>
Oil extraction X microalgae	186
Microalgae oil X fatty acid	137
Essential fatty acid X microalgae	5
Taguchi method X microalgae	7

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Conforme a pesquisa, na Figura 1 observa-se que, em 2008, foi registrada uma publicação acerca da extração de óleo a partir de microalgas. Em 2013 e 2017, no caso, foram registradas 23 publicações e, em 2018, 10 publicações. Os resultados mostram que pesquisas

na área de extração de óleo a partir de microalgas têm se tornado crescente em razão da relevância do tema.

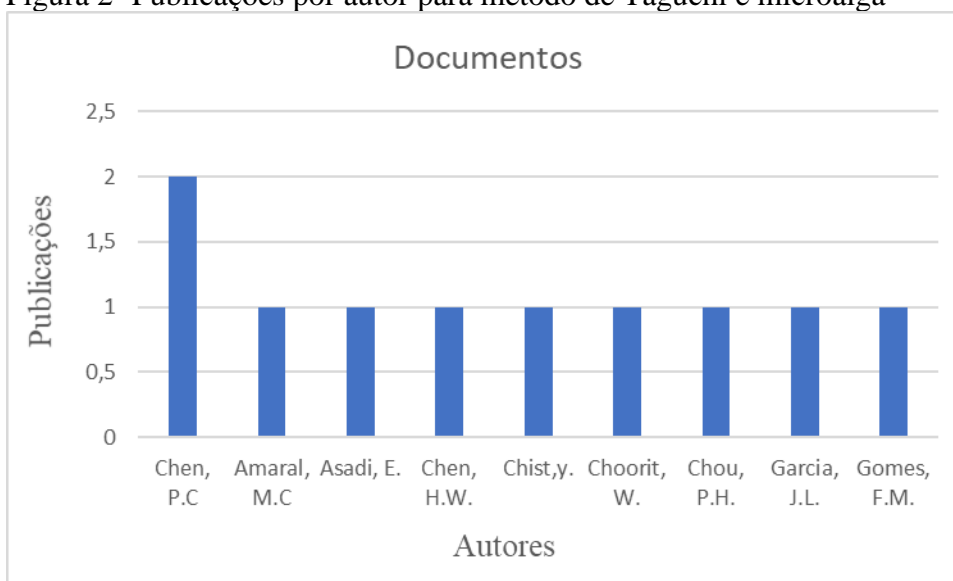
Figura 1- Publicações por ano para extração de óleo a partir de microalgas



Fonte: Scopus (2018)

Na Figura 2 estão os autores com publicações na área de modelagem que usaram o Método de Taguchi para desenvolver pesquisas com microalgas, são eles: Chen (2017); Amaral (2018) e Asadi (2018).

Figura 2- Publicações por autor para método de Taguchi e microalga



Fonte: Scopus (2018)

Ao analisar os artigos desses autores observa-se que há uma interação entre as linhas de pesquisas, pois investigam sobre microalgas utilizando o Método de Taguchi para obter resultados satisfatórios.

Chen (2017) fez uma pesquisa sobre a captura de CO<sub>2</sub> a partir da solução de cultura das microalgas. Assim, foi explorado em um depurador contínuo de colunas de bolhas só um ambiente de pH constante. As condições ótimas para um estudo em escala piloto foram avaliadas. Com o Método Taguchi, foram necessárias dezesseis corridas. A taxa de absorção, a eficiência de absorção, o coeficiente de transferência de massa global e a taxa de vazão gás-líquido foram determinados por um modelo de balanço de material e um modelo de dois filmes em condições de estado estacionário.

Amaral (2018) utilizou o Método de Taguchi para obter as melhores condições de cultura em fotobiorreatores de colunas de bolhas, a fim de melhorar a produtividade de biomassa e ácidos graxos por microalgas marinhas. As variáveis independentes consideradas no cultivo de *Chlorella minutissima* foram: porcentagem de dióxido de carbono, concentração de nitrato, concentração de fosfato, suplementação de metais e vitaminas, temperatura e salinidade.

Asadi (2018) fez uma pesquisa que propôs um modelo de instalação de produção de biomassa de algas, várias instalações de distribuição, múltiplos locais de extração. Esse modelo permite que o tomador de decisão determine o número e a localização das instalações de distribuição e o melhor local de extração para essas instalações. Conforme esse propósito, foram utilizados dois algoritmos metaheurísticos multiobjetivos e o Método de Taguchi, usado para definir os parâmetros desses algoritmos e, em seguida, comparar os resultados a partir de cinco critérios distintos de avaliação.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS MICROALGAS

As microalgas estão entre as formas mais antigas de vida do planeta. Elas foram precursoras das plantas e são organismos microscópicos fotossintéticos que podem ser encontrados em todo o mundo, principalmente nas águas, em ambientes marinhos e de águas doces (LOURES, 2016).

Podem ser classificadas em algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*). Têm alta taxa de crescimento e podem, assim, sintetizar e acumular rapidamente quantidades elevadas de lipídios em comparação com as plantas terrestres. É estimado que existem mais de 50 mil espécies, mas apenas um número limitado, cerca de 30.000, foi estudado e analisado (MATA et al, 2009; OLIVEIRA et al, 2014).

As microalgas eucarióticas possuem a capacidade de conter grandes quantidades de compostos ricos em energia, tais como triacilglicerol e amido, que podem ser utilizados na produção de vários produtos, incluindo biodiesel e bioetanol (OLIVEIRA et al, 2014). As microalgas dispõem de um elevado teor de óleo, porém ocorre uma variação em tal volume de espécie para espécie. Essas variações podem ser evidenciadas no Quadro 2.

Quadro 2- Conteúdo de óleo de microalgas

Microalga	Teor de óleo (% de peso seco)	Referências
<i>B. braunii</i>	25-75	Chisti (2007)
<i>Chlorella emersonii</i>	63	Illman et al. (2000)
<i>Chlorella minutíssima</i>	57	Illman et al. (2000)
<i>C. vulgaris</i>	56,6	Liu et al. (2007)
<i>C. vulgaris</i>	40	Illman et al. (2000)
<i>C. protothecoides</i>	23	Illman et al. (2000)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	22	Illman et al. (2000)
<i>C. cohnii</i>	20	Chisti (2007)
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35	Chisti (2007)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68	Chisti (2007)
<i>N. oleoabundan</i>	54	Metting (1996)
<i>Chlorella sp.</i>	28-32	Chisti (2007)

Fonte: Singh & Dhar (2011)

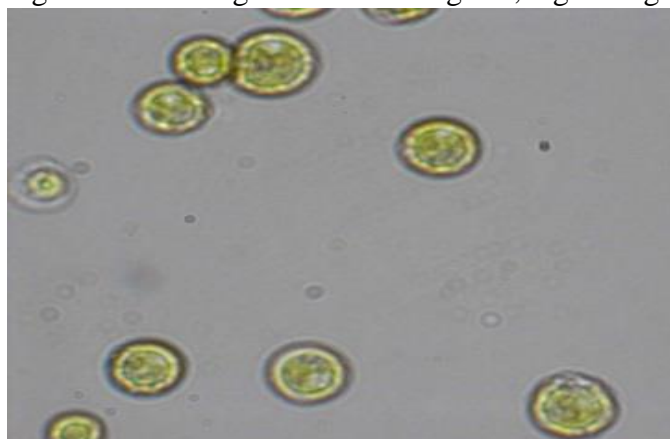
Analisando o Quadro 2, observa-se que algumas espécies de microalgas são mais propícias para a obtenção de óleo. De acordo com Singh & Dhar (2011), o teor de óleo em microalgas pode exceder 80% em peso de biomassa seca. Outros autores, como Zorn et al (2017), afirmam que os lipídios encontrados nas células microbiais dependem da espécie de microalga e das condições de cultivo e alegam ter encontrado um teor de óleo mais alto na espécie *Nannochloropsis*.

## 2.2 CHLORELLA VULGARIS

O nome da microalga *Chlorella* provém do grego *Chloro* (verde) e do sufixo diminutivo latino *ella* (pequeno), compreendendo em um gênero de algas verdes unicelulares, do Filo Chlorophyta. É uma microalga unicelular, microscópica, eucariótica, esférica, como ilustra a Figura 3, encontrada em tanques e lagos com alta capacidade de realizar fotossíntese (VIDAL, 2016).

A principal forma de reserva é o amido, porém, sob certas condições, podem armazenar óleo e contém mais de 2% de clorofila, o que permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese. Vale salientar que a *Chlorella* também é rica em Vitaminas do complexo B, principalmente B12 (VIEIRA, 2013).

Figura 3- Microalga *Chlorella Vulgares*, alga da água doce



Fonte: Rios et al (2016)

O conteúdo e a composição dos lipídios e ácidos graxos em microalgas podem ser influenciados por fatores relacionadas ao cultivo como luz, temperatura, concentração da fonte de nitrogênio e concentração de dióxido de carbono (MORAIS et al, 2008).

O nitrogênio é um importante elemento para o metabolismo das microalgas, sendo que a redução da quantidade desse elemento no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente. O aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura pode elevar o teor de clorofila na biomassa microalgal (BERTOLDI et al, 2008).

O estudo dos efeitos da adição de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no crescimento e metabolismo de microalgas é estimulado pela necessidade de redução da emissão desse gás na atmosfera. As microalgas têm sido estudadas para biofixação de CO<sub>2</sub> desde que foi demonstrada sua capacidade de adaptação a altas concentrações desse gás (ILLMAN, 2000).

### 2.3 MICROALGAS, SEUS DIVERSOS PRODUTOS E APLICAÇÕES

A produção comercial de microalgas teve início na década de 60 com espécies de *Chlorella* e *Spirulina*, como suplementos dietéticos, *Dunaliella* salina para obtenção de β-caroteno, *Haematococcus* pluvialis para produção de astaxantina e diversas outras espécies para aplicação na aquicultura. Na mesma década, as pesquisas em biotecnologia de microalgas direcionavam esforços para reciclagem de águas residuais, sua aplicação em programas espaciais de renovação atmosférica e fonte de alimento (BERTOLDI et al, 2008).

Para Zorn (2017), as microalgas podem ser usadas com várias finalidades: industrial, nutricional, farmacêutico e medicinal (vacinas). Algumas espécies produzem ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa de alto valor (PUFAs), pertencentes às famílias de ômega 3 e 6. Sendo que muitas microalgas são ricas em compostos bioativos e pigmentos, incluindo clorofilas, carotenoides, terpenos, além de antioxidantes e redutores de colesterol (denominados compostos bioativos naturais), os quais podem ser utilizados no desenvolvimento de alimentos funcionais.

Os ácidos graxos são importantes constituintes da dieta humana, apresentando efeitos terapêuticos e desempenhando relevante papel tecnológico na indústria de alimentos e no campo energético. Além do biodiesel, existem diferentes tipos de biocombustíveis como metano, hidrogênio, bio-óleo e bioetanol (COSTA, 2006; ZORN et al, 2017).

O teor de ácidos graxos polinsaturados produzidos pela microalga pode ser determinado pela espécie cultivada, concentração dos nutrientes do meio de cultura, fluxo de

aeração, luminosidade, tempo do fotoperíodo e a temperatura do cultivo (LOURENÇO, 2006).

A microalga *Chlorella* possui capacidade fotossintética, é rica em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos. Além disso, *Chlorella* é considerada GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA, podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana (COSTA, 2006).

A biotecnologia de microalgas também demonstrou versatilidade em outros setores, podendo atuar no tratamento de efluentes, biorremediando metais pesados, nitrogênio e fósforo que podem causar eutrofização quando descartados diretamente nos rios. A biomassa obtida nessa biorremoção pode servir como fonte de matéria-prima para produção de ração, fertilizantes, e até mesmo ser utilizada na indústria de química fina, uma vez que a biossíntese de diversos produtos de alto valor metabólico pode ser alcançada pela engenharia de transcrição (TE), que pretende modificar vários componentes simultaneamente. No entanto, além de serem fontes geradoras de biodiesel, verifica-se que diversas substâncias de alto valor agregado são produzidas por microalgas (BERTOLDI et al, 2008; ZORN et al, 2017).

#### 2.4 POTENCIALIDADE DAS MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

As microalgas são microrganismos autotróficos procariontes ou eucariontes. São também organismos microscópicos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais em razão da sua estrutura celular simples, unicelular ou multicelular. A biodiversidade de microalgas é enorme e elas representam um recurso quase inexplorado (LOURES, 2016; OLIVEIRA et al, 2014).

Chisti (2007) e Mata et al (2009) caracterizam as microalgas como microrganismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzir várias formas de energia produtoras de biomassa (polissacarídeo, proteína, lipídio e hidrocarboneto). Esses microrganismos, portanto, podem ser utilizados na produção de biocombustíveis, suplementos alimentares e empregados na captura de dióxido de carbono da atmosfera. Por essas características, as microalgas têm potencial para a redução dos gases responsáveis pelo efeito estufa devido ao sequestro de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Para Ahmad (2011), considerando tais características, pode ser uma boa alternativa substituir o biodiesel proveniente de matéria-prima tradicional. Mais de 95% desse tipo de

biodiesel é feito a partir de óleos alimentares. Por exemplo, conforme a Tabela 1, a palma e a soja são culturas cujos óleos são parte vital na alimentação humana. Assim, desviar essas culturas alimentares para a produção de óleo em grande escala de produção de biodiesel poderá trazer desequilíbrio para o mercado mundial de produtos alimentícios.

Tabela 1- Comparação de microalgas com outras matérias-primas de biodiesel

Matéria-prima (% m.m-1)	Produtividade em óleo (L/m <sup>2</sup> )	Área necessária (m <sup>2</sup> ,ano-1,kg-1 Biodiesel)	Teor de óleo
Milho	172	1540	44
Soja	446	594	18
Canola	1190	223	41
Palma	5950	45	36
Microalga (teor elevado de óleo)	136,900	2	70
Microalga (teor reduzido de óleo)	58,700	4,5	30

Fonte: Chisti (2007) e Mata (2009)

Analisando os dados da Tabela 1, observa-se que as microalgas poderão ser uma fonte promissora de energia renovável em comparação com as fontes de culturas oleaginosas.

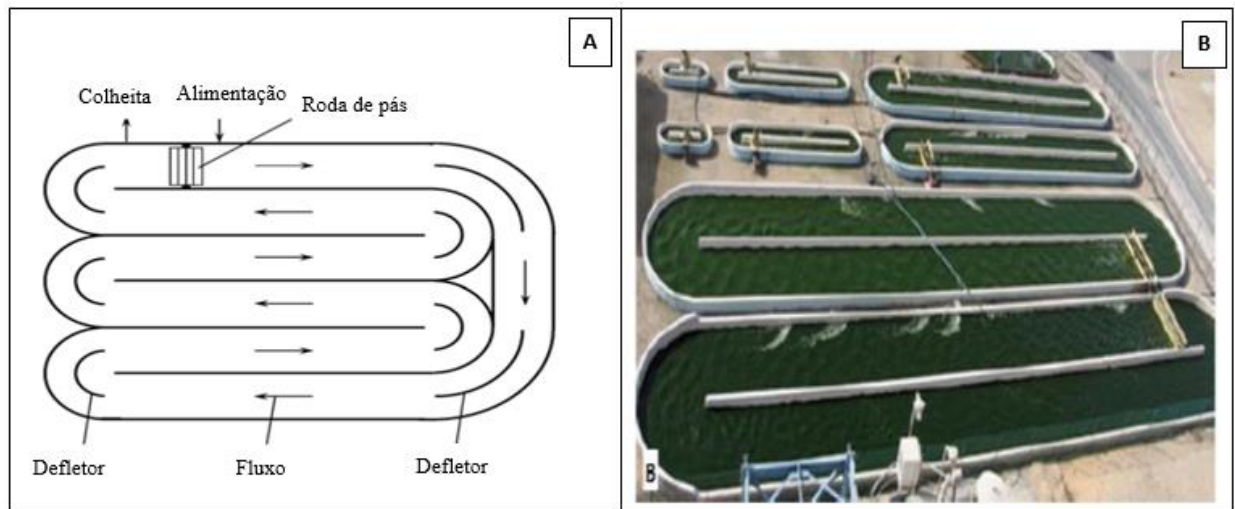
## 2.5 CULTIVO DAS MICROALGAS

O cultivo de microalgas pode ser realizado em dois sistemas: aberto *raceway* (lagoas) e fechado (fotobiorreatores). O meio de crescimento deve fornecer os elementos inorgânicos essenciais que constituem a célula de algas, por exemplo, nitrogênio (N), fósforo (P) e ferro (CHISTI, 2007). Nas palavras de Pereira et al (2012), nos sistemas fotossintéticos a produção de biomassa é realizada por meio da conversão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), energia luminosa, nutrientes inorgânicos e o cultivo fotossintético permite o emprego de sistemas abertos, a partir dos quais os cultivos estão expostos, ou seja, em contato direto com a atmosfera, e de sistemas fechados, em que o contato com a atmosfera é significativamente reduzido ou inexistente.

### 2.5.1 Raceway

O sistema aberto é constituído por canais de recirculação independentes Figura 4, conhecidos como pistas de corrida (*raceways*), com profundidade que varia entre 20 cm e 30 cm. A recirculação e a agitação são promovidas pela ação de pás fixas no início de cada lagoa (DZUMAN, 2013).

Figura 4 – Sistema de cultivo aberto em tanque (*raceway*)



Fonte: Figura A Chisti (2007) e Figura B Gaivão (2013)

Esse método de cultivo tem baixo custo para sua implantação, porém apresenta alguns entraves como a baixa produtividade, exposição às flutuações diárias de temperatura e vulnerabilidade à contaminação por microrganismos ou outras algas (ZHU et al, 2014; DZUMAN, 2013).

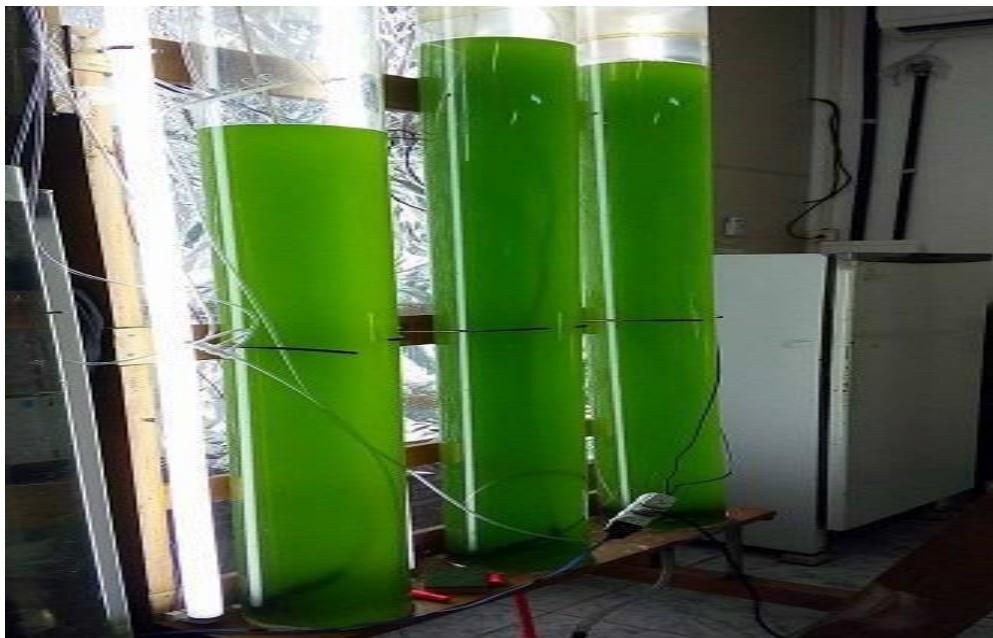
### 2.5.2 Fotobiorreator

O sistema fechado para o cultivo de microalga é denominado de fotobiorreator Figura 5. Sendo ele constituído por materiais como tubos de plástico, vidro ou policarbonato, o formato dos tubos pode ser disposto de várias formas, dependendo da adequação do sistema (DZUMAN, 2013).

Nos fotobiorreatores é possível controlar as condições de cultivo, tais como quantidade de nutrientes, temperatura, iluminação e pH. Assim, esses sistemas permitem uma

alta produtividade de biomassa quando comparados com os sistemas abertos (CHISTI, 2007; DZUMAN, 2013).

Figura 5 - Sistema fechado de cultivo



Fonte: Zorn (2017)

Vários modelos de fotobiorreatores podem ser encontrados. Contudo, deve-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 (LOURES, 2016).

## 2.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

### 2.6.1 Método Bligh & Dyer.

O método Bligh & Dyer (1959) é uma releitura do método de Folch, de extração de lipídios a partir de amostras que contêm pouco teor de lipídios e uma alta proporção de água. O método consiste nas seguintes etapas: 1 mL de amostra, adicionar 3,75 mL de 1:2 (volume/volume) de clorofórmio/metanol com agitação vigorosa. Em seguida, adicionar 1,25 mL clorofórmio em constante agitação até o final do preparo da mistura e em seguida adicionar 1,25 mililitros de água destilada. Centrifugar a 1000 rotações por minuto, durante 5

minutos. A fase inferior é extraída com uma pipeta de Pasteur e retira-se cerca de 90% da fase inferior (a que contém lipídios) (BLIGH & DYER, 1959; VIDAL, 2014).

### **2.6.2 Método Folch**

O método de Folch consiste na utilização dos reagentes clorofórmio-metanol na proporção (2/1). Com isso, após a dispersão a mistura dos reagentes é agitada durante 15 a 20 minutos. A mistura é filtrada ou centrifugada para recuperar a fase líquida. O solvente é lavado com 0,2 volumes com solução de cloreto de sódio a 0,9 %. Depois da centrifugação e de separação da fase superior, a fase inferior de clorofórmio contendo lipídios é evaporada a vácuo em um rotaevaporador (FOLCH et al., 1957; VIDAL, 2014).

### **2.6.3 Método de extração Soxhlet**

O método de extração que utiliza solventes químicos. O óleo é extraído por meio de lavagens repetidas, ou de percolação, com um solvente orgânico tal como o hexano ou éter de petróleo, sob refluxo (VIDAL, 2014). Esse processo de extração é intermitente, pode ser utilizado somente com amostras sólidas, tem a vantagem de evitar a temperatura alta de ebulição dos solventes, tem a desvantagem da possível saturação do solvente que permanece em contato com a amostra (CECCHI, 2003).

### **2.6.4 Método extração com fluido supercrítico**

A extração com fluido supercrítico é um método inovador a partir do qual o gás CO<sub>2</sub> sofre pressão e aquecimento, adquirindo ambas propriedades de líquido e gás. Tal fluido liquefeito atua como solvente, extraindo o óleo da matéria-prima (PEREIRA et al, 2012).

### **2.6.5 Método de extração por ultrassom**

A sonicação intensa de líquidos gera ondas sonoras que se propagam para o meio líquido resultando em ciclos alternados de alta e de baixa pressão. Durante o ciclo de baixa pressão, pequenas bolhas de vácuo são criadas no líquido. Quando as bolhas atingem um determinado tamanho, elas entram em colapso violentamente durante o ciclo de alta pressão.

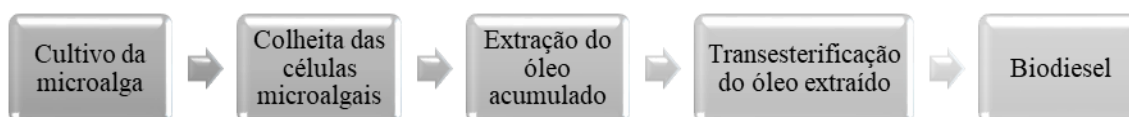


Isto é chamado de cavitação. Durante a implosão jatos de líquidos de alta velocidade e pressão são produzidos localmente. As forças de cisalhamento resultantes quebram a estrutura celular mecanicamente e melhoram a transferência de massa (VIDAL, 2014).

## 2.7 OBTENÇÃO DO BIODIESEL

Segundo Oliveira et al (2014), a produção do biodiesel a partir das algas tem início na seleção de espécies de microalgas, considerando as condições específicas dos locais, bem como a elaboração e a implementação do sistema de cultivo para o crescimento de microalgas. Posteriormente, segue-se a colheita de biomassa e a extração do óleo para, depois, se processar a produção de biodiesel, conforme ilustra a Figura 6.

Figura 6: Etapas de obtenção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas



Fonte: Zorn et al. (2017)

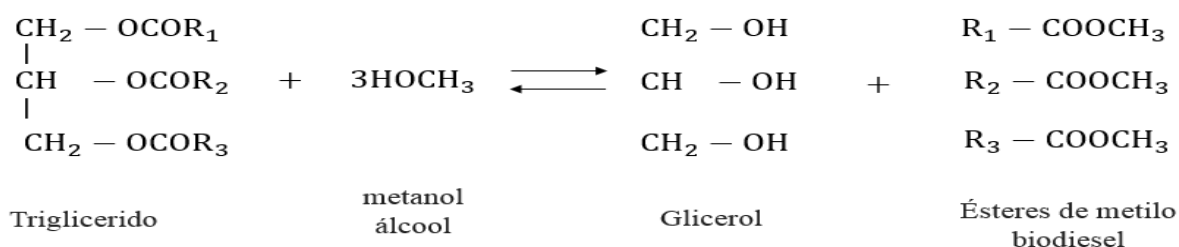
Loures (2016) especifica que a biomassa produzida a partir de microalgas pode ser convertida em biocombustíveis de diferentes maneiras, que podem ser classificados em três subclasses: química, bioquímica e termoquímica. A seleção adequada dos métodos de conversão é determinada pela quantidade de biomassa obtida, pela forma de energia final desejada e pela viabilidade econômica.

No entanto, para muitos pesquisadores o método mais viável é a transesterificação química. Para Ahmad (2011), esse método é mais promissor levando em conta a alta viscosidade do óleo.

Para Loures (2016) e Farag et al (2011), a transesterificação química é o método mais usado no processo de obtenção do biodiesel a partir do óleo microbiano. Para Chisti (2007), a transesterificação é a reação dos triglicerídeos com metanol, que produz ésteres de metilo de ácidos graxos, que são o biodiesel e o glicerol Figura 7.

Mata et al. (2009) aponta que essa reação poderá ser mais eficiente na presença de um catalisador, que pode ser um ácido ou uma base usada para melhorar a taxa de reação de transesterificação.

Figura 7 –Transesterificação de óleo para biodiesel



Fonte: Chisti (2007)

A catálise alcalina conduz uma reação mais rápida e mais rentável do que a catálise ácida nos processos de produção de biodiesel. No entanto, como os óleos microalgais apresentam elevados índices de acidez, a transesterificação por catálise ácida apresenta-se como a rota mais adequada para a produção de biodiesel a partir dos lipídeos microalgais (ZORN, et al., 2017).

Alternativamente ao método tradicional de transesterificação, um método promissor é a transesterificação *in situ*, processo no qual a conversão dos ácidos graxos em seus alquil ésteres ocorre diretamente na biomassa, eliminando assim a etapa de extração por solvente e aliviando a necessidade da secagem da biomassa durante a colheita reduzindo drasticamente o custo do processo (AMARO et al, 2011).

## 2.8 VIABILIDADE ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DO BODIESEL DE MICROALGAS

De acordo Araújo et al (2012), a viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas depende da diminuição dos custos de produção. De forma técnica, a produção de biodiesel é viável, porém, em termos financeiros, encontra certos entraves, uma vez que seu custo pode ser mais elevado que a produção de diesel de petróleo.

Nesse sentido, os impedimentos para a cultura em grande escala de microalgas são principalmente econômicos, pois demandam energia para o cultivo, métodos eficientes para recuperar a biomassa de microalgas produzidos em fotobiorreactores. Além disso, são necessários processos de extração que possibilitem a recuperação do óleo de microlagas (CHISTI, 2013).

Os elevados custos associados ao processamento da biomassa para produção do biodiesel conformam-se como o ponto mais discutível do processo, estimula-se a produção por meio de financiamentos e a comercialização dos subprodutos são práticas necessárias para que o biodiesel de microalgas se torne economicamente atrativo (ARAÚJO et al, 2012).

Chisti (2013) aponta que o biodiesel produzido por meio de óleo de microalgas poderá assumir diferentes valores consoante os métodos utilizados para a sua produção, os quais fazem referência à recuperação de óleo a partir da biomassa de microalgas e a conversão do óleo em biodiesel. Assim, o custo de produção da biomassa é um fator relevante para uma avaliação comparativa dos fotobiorreatores e *raceways* para a produção de biodiesel de microalgas. Como base de comparação, no caso, existe o óleo de palma, que é provavelmente o óleo vegetal mais barato.

Em suma, ao considerar a necessidade de diminuição da dependência de petróleo e de práticas salutares ao meio ambiente, a produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas se apresenta como uma solução viável na busca por fontes alternativas de energia (KHAN et al, 2009).

## 2.9 MÉTODO DE TAGUCHI

Os gráficos lineares foram desenvolvidos por Taguchi para facilitar a atribuição de experimentos. Esses gráficos podem ser usados para atribuir interações entre fatores em uma matriz para calcular interações no projeto de experimentos (TAGUCHI, 1987).

Chiang (2009) evidencia que o método de Taguchi é considerado uma robusta ferramenta matemática capaz de descobrir os parâmetros significativos de um processo ideal a partir de aspectos qualitativos múltiplos.

Segundo Amaral (2014), a aplicação do método de Taguchi consiste em:

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

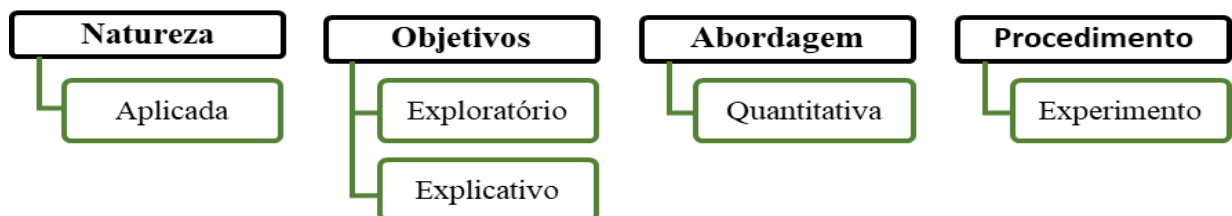
O método de Taguchi utiliza arranjos ortogonais, que são tabelas organizadas em que as colunas para as variáveis independentes são ortogonais. Sendo assim, com esse modelo formam-se matrizes, visto que as combinações de múltiplos fatores podem ser verificadas em diferentes níveis. Essas matrizes são organizadas para garantir que todos os fatores de todos os níveis são considerados igualmente, sendo os fatores avaliados de forma independente (PHADKE, 1989).

O método de Taguchi é uma abordagem que mescla técnicas estatísticas, engenharia e a análise dos dados experimentais usando análise de variância (ANOVA). Além disso, fornece informações sobre os fatores estatisticamente significativos e seus níveis ideais para alcançar as respostas desejadas. Por meio da ANOVA são comparados dois ou mais fatores, verificando a sua significância (teste F), bem como pode determinar quais fatores são realmente mais significantes no processo ou problema em estudo. Sendo assim, é possível estudar um grande número de variáveis com um pequeno número de experimentos, economizando tempo e reduzindo custos (ZORN, 2017).

### 3 MATERIAL E METÓDO

Para Gerhardt & Silveira (2009), este trabalho pode ser classificado como uma pesquisa aplicada com objetivos exploratórios e explicativos, sendo que a abordagem do problema foi quantitativa e o procedimento de pesquisa adotado caracterizou a realização de experimentos, Método de Taguchi e ANOVA, expostos na Figura 8.

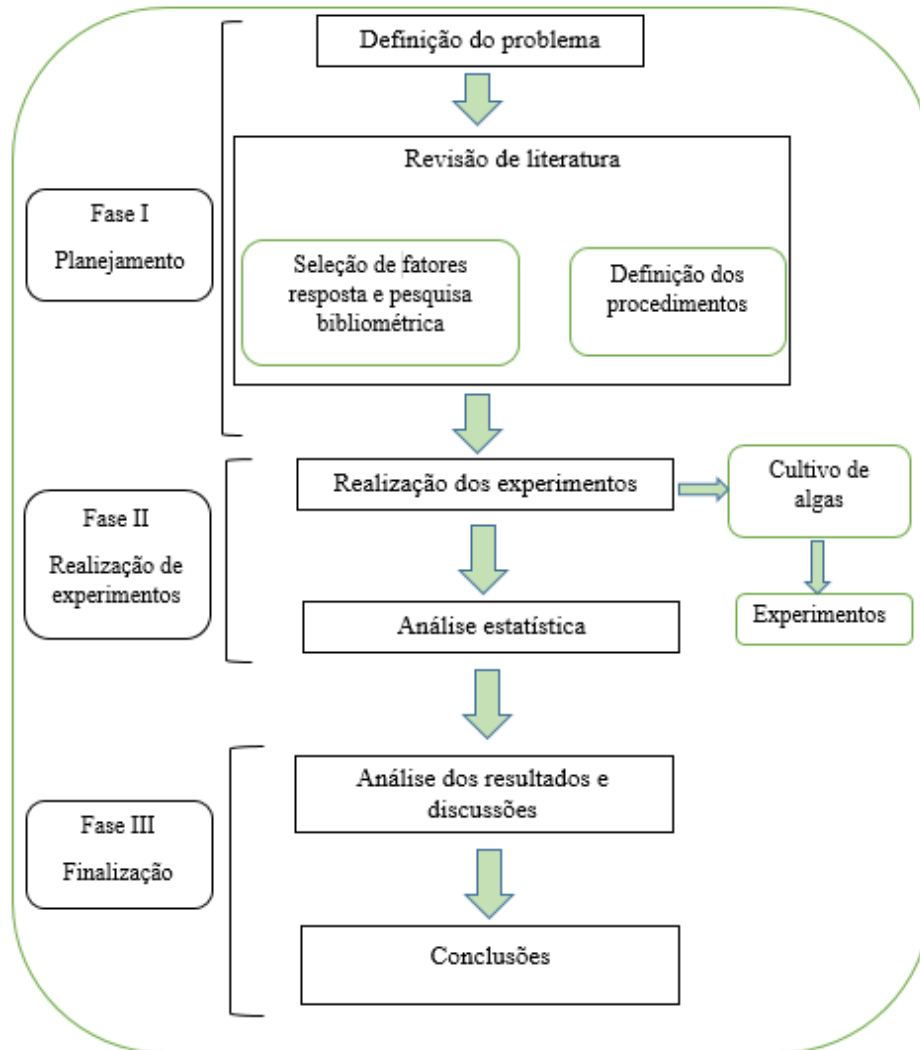
Figura 8 –Classificação da Pesquisa



Fonte: Gerhardt & Silveira (2009)

O desenvolvimento das etapas da pesquisa pode ser observado na Figura 9, a qual contém a primeira fase de planejamento da pesquisa, a segunda fase de realização dos experimentos, as extrações de óleo e, para finalizar, a terceira etapa consolidada com os resultados, discussões e conclusões. As etapas desenvolvidas na metodologia seguiram a ordem do cronograma no Anexo1.

Figura 9 – Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

### 3.1 LINHAGEM DA MICROALGA

Todos os experimentos foram realizados com a linhagem da microalga da água doce *Chlorella vulgaris*, pertencente ao Banco de Microrganismos Aidar & Kutner do Instituto Oceanográfico da USP - São Paulo. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química do Instituto Federal de Roraima- *Campus* Novo Paraíso.

### 3.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução dos experimentos e na preparação dos meios de cultura foram de grau padrão analítico para microbiologia, que permitem menor variabilidade e maior precisão no meio de cultivo. A Tabela 2 apresenta os reagentes necessários para a preparação do Meio Bold Basal (BBM) (LOURENÇO, 2006).

Tabela 2 - Reagentes utilizados para a preparação do meio de cultivo.

Reagentes	Concentração
NaNO <sub>3</sub>	150g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5g/l
KH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>	17,50g/l
NaOHCO <sub>3</sub>	7,5 g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18g/l
EDTA-Na <sub>2</sub>	25g/l
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75g/l
Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O	0,12g/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,12g/l
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,03g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,10g/l

Fonte: Lourenço (2006).

### 3.1.2 Preparo dos materiais

Para cada cultivo, todo o material de vidraria a ser usado foi lavado em água corrente, rinsado com água destilada e autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Os erlenmeyers para cultivo estoque foram utilizados como tampa pedaços de papel alumínio. A inoculação das microalgas foi realizada próximo da chama de lamparina e o cultivo em sala climatizada; a iluminação foi feita com lâmpadas fluorescentes. As soluções estoque utilizadas na

preparação do meio de cultivo foram autoclavadas a 0,5 atm de pressão e 110°C de temperatura (AMARAL, 2014).

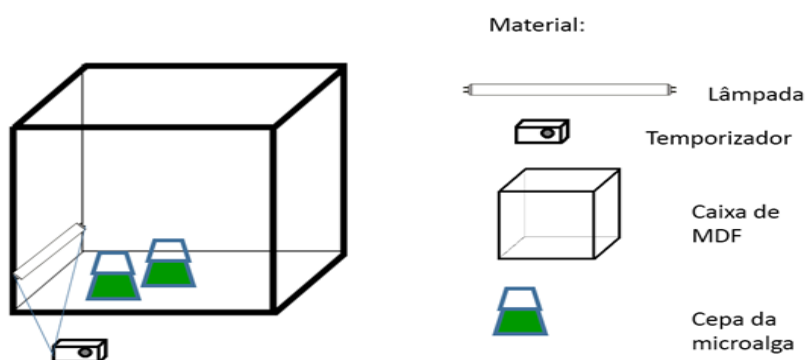
Os fotobiorreatores foram escovados e lavados com água corrente e detergente, assim como foi adicionado hipoclorito de sódio em solução para a completa desinfecção. Posteriormente, o hipoclorito de sódio residual foi neutralizado com tiosulfato de sódio (ZORN, 2017).

### 3.1.3 Cepário

A manutenção das cepas foi realizada em caixas de MDF providas com lâmpada fluorescente de 15W, ligada a um reator e um temporizador, que controlava em fotoperíodo em 12h luz/ 12h escuro em que são cultivadas no meio de cultivo BBM, com a finalidade de fornecer cepas ao longo do experimento. A Figura 10 ilustra o equipamento.

As repicagens para manutenção das cepas estoques independentes dos inócuos para os experimentos, foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento. Repicagem foi feita em erlenmeyer de 200ml, nos quais foram sempre mantidos cinco erlenmeyers, gerados por repicagens com intervalos entre 10 a 15 dias. As repicagens foram realizadas na proporção de 1:10 (10mL da cultura antecessora para 90mL de meio de cultura novo).

Figura 10 - Desenho esquemático do Cepário



Fonte: Loures (2016).



### 3.1.4 Fotobiorreator

Foi projetado um sistema fotossintético que recebeu os cultivos de microalgas. Com isso, foram utilizados 8 galões de plástico de 4L, o sistema de aeração foi viabilizado por meio de bombas de aquário, conectadas a um difusor (pedra porosa), para a dispersão de microbolhas de ar no sistema. Os cultivos foram realizados em triplicatas nos fotobiorreatores, sendo a concentração do inoculo de 10 % (v/v).

As iluminações foram feitas em dois painéis, sendo que houve a divisão para os níveis de iluminação, isto é, o da direita permaneceu ligado durante todo o experimento e possuía 6 lâmpadas fluorescentes. O painel da esquerda possuía 3 lâmpadas fluorescentes e mantiveram uma iluminação controlada por temporizador analógico, que controlava em fotoperíodos de 12h luz/ 12h escuro, fornecidas a partir de lâmpadas fluorescentes de 20 W, tipo luz do dia conforme a Figura 11.

Figura 11- Sistema de fotobiorreatores: Laboratório de Química do IFRR

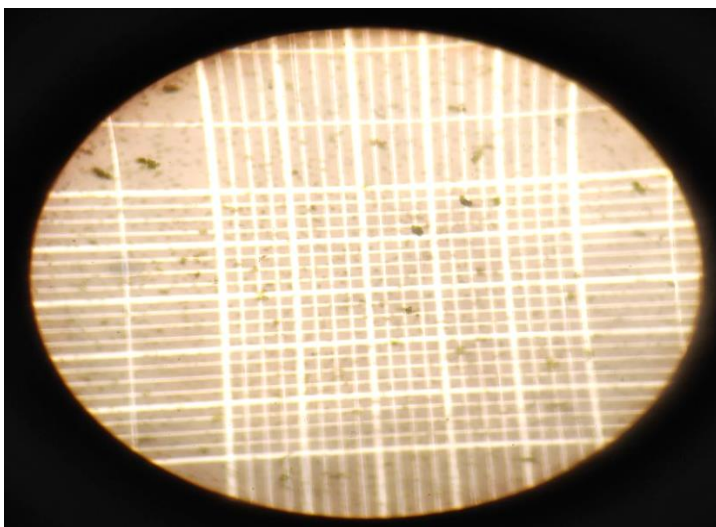


Fonte: Arquivo fotográfico da autora (2018)

### 3.1.5 Acompanhamento dos cultivos

O crescimento das microalgas durante os cultivos foi acompanhado por análise de absorvância em espectrofotômetro UV-VIS, selecionando o comprimento de onda de 680 nm para a realização das leituras de absorvância para acompanhamento da reprodução de microalgas e também foram realizadas análise de contagem celular por meio do microscópio em câmara de Neubauer, conforme a Figura 12 (ZORN, 2017).

Figura 12 – Fluxograma das etapas desenvolvidas na pesquisa



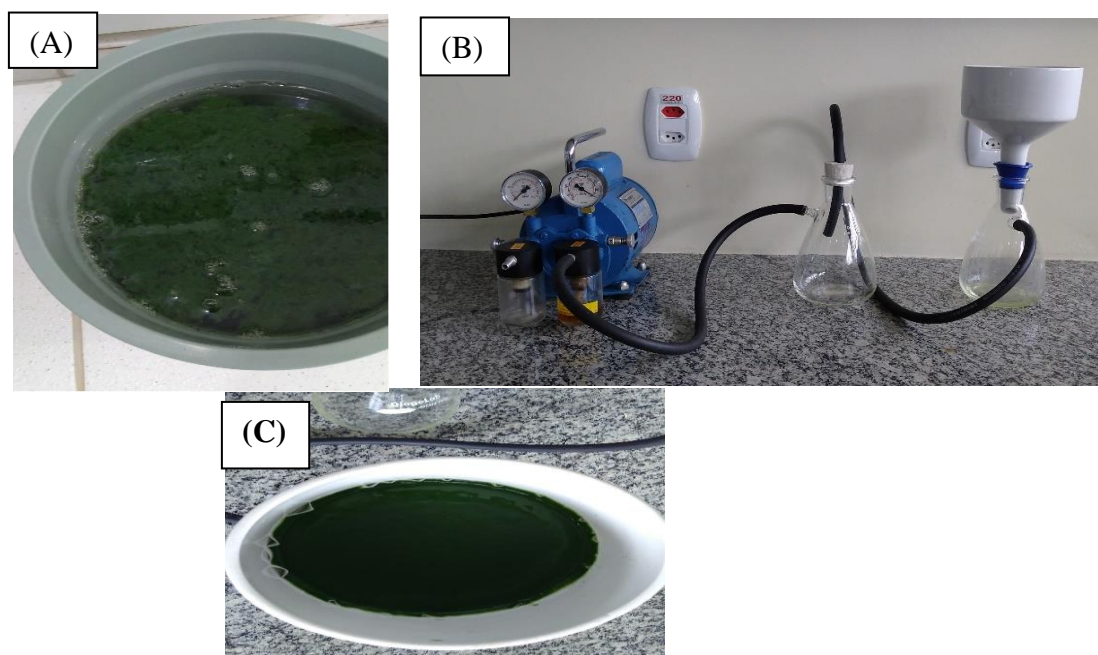
Fonte: Elaborado pela autora (2018)

### 3.1.6 Colheita, floculação da biomassa e filtração

Após cerca de sete dias de cultivo nos fotobiorreatores, com aeração constante, procedeu-se a etapa de colheita da biomassa que constituiu em um dreno de todo o volume dos fotobiorreatores para baldes de polietileno, onde foi adicionado solução de sulfato de alumínio na proporção de 2ml da solução flocculante para cada litro de cultivo.

Após cerca de 30 minutos ocorreu a separação das fases com a concomitante decantação da biomassa. Em seguida, com a floculação ocorreu a retirada do excesso de água e, com isso, a biomassa foi filtrada a vácuo, utilizando um sistema com Kitassato e funil de porcelana com papel de filtro, conforme as Figuras 13 (A), (B), (C) (ZORN, 2017; LOURES, 2016).

Figura 13- (A):Biomassa flokulada; (B): Filtração da biomassa a vácuo; (C): Biomassa filtrada.

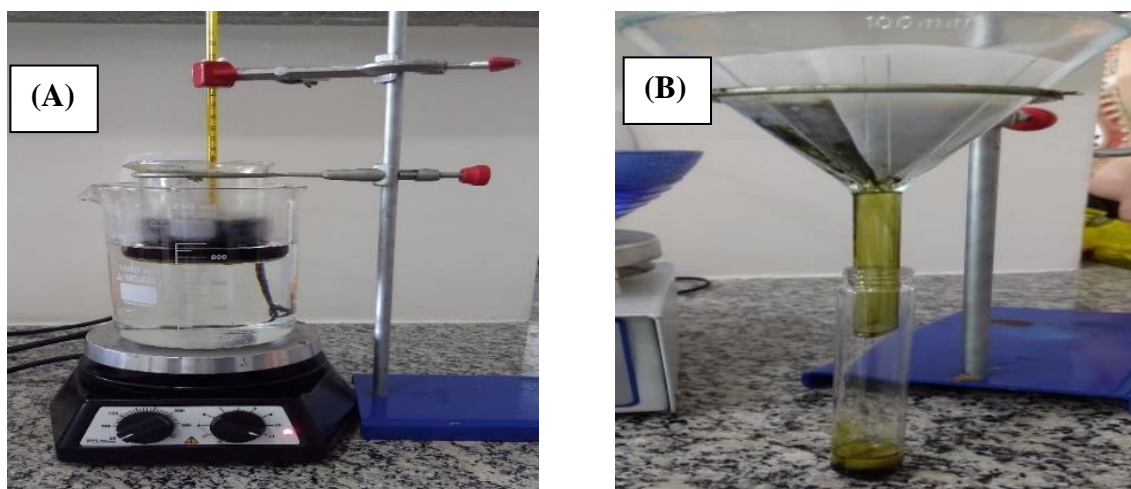


Fonte: Elaborado pela autora (2018)

### 3.1.7 Determinação dos lipídeos método Bligh & Dyer

Os de lipídios totais foram determinados segundo metodologia de Bligh & Dyer (1959). Os lipídeos foram extraídos da biomassa seca, a qual foi colocada inicialmente em um béquer com os solventes clorofórmio, metanol e água na proporção de 1:2:0,8, respectivamente. As amostras foram agitadas até se tornar homogêneas. Em seguida, a mistura foi colocada em banho-maria em placa de agitação magnética por 3 horas. Após esse período a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo. Na sequência, então, foi descartada a massa retida. Ao filtrado foi adicionado clorofórmico e água, bom como colocado em uma centrífuga a 1000 rpm por 3min, conforme as Figuras 14 (A), (B), para promover a separação das fases apolar (lipídica) e polar. Depois da separação foi realizada a evaporação do solvente em estufa a 60° C.

Figura 14 - (A): Banho-maria com agitação; (B): Filtração e separação de fases



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

### 3.1.8 Determinação de lipídeos método Zorn

Os lipídios totais foram determinados segundo metodologia de Zorn (2017). Eles foram extraídos da biomassa úmida a qual possuía 64% de umidade, sendo que o processo de extração ocorreu em três etapas distintas.

Etapa 1: adicionou-se de 19,4 ml de clorofórmico e 10,2 ml de metanol ao Erlenmeyer contendo a amostra hidratada, agitada manualmente por 2 minutos e agitação via banho de ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente, conforme a Figura 15.

Etapa 2: retirada do Erlenmeyer do banho ultrassom, adição de 10 ml de clorofórmio. Realizou-se a agitação manual por 2 minutos e, em seguida, nova agitação ao banho de ultrassom por 25 minutos em temperatura ambiente.

Etapa 3: retirada do Erlenmeyer do banho de ultrassom, adição de 3,4 ml de água destilada, agitação manual por 2 minutos. Após essa etapa foi realizada a filtração do conteúdo do Erlenmeyer com papel filtro. A biomassa ficou retida no papel de filtro e o filtrado foi transferido para um funil de separação, no qual permaneceu em repouso até a separação de fases.

Após a separação de fases, o filtrado foi colocado em frascos que foram levados para a estufa a 55-60 °C para evaporação do solvente. Finalizada a evaporação, os frascos foram retirados da estufa e deixados em dessecador por 15 minutos para resfriamento em temperatura ambiente.

Figura 15 - Amostras em agitação via banho de ultrassom



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

## 3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 O método de Taguchi (arranjo ortogonal L8)

Utilizou-se a matriz L8 de Taguchi para o planejamento experimental exploratório, as variáveis (fatores) propostas foram: Aeração, Nitrato ( $\text{NO}_3$ ), Fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), intensidade de luz e fotoperíodo. A Tabela 3 apresenta as variáveis e seus parâmetros com os respectivos níveis selecionados. Foram utilizados esses fatores com o intuito de obter a melhor resposta para o crescimento celular e teor de lipídeos, extraído da alga, conforme a Tabela 4, que apresenta o arranjo ortogonal da matriz L8 de Taguchi.

Tabela 3- Microalga *Chlorella vulgaris*, fatores da matriz L8 de Taguchi

Códigos	Fatores	Nível Baixo (-)	Nível Alto (+)
A	Aeração	1,67	3,33
B	$\text{NO}_3$ (g/l)	0,25	0,50
C	$\text{PO}_4^{-3}$ (g/l)	0,35	0,65
D	$\text{NaHCO}_3$	0,25	0,50
E	Intensidade de luz	0,85	14,50
F	Fotoperíodo	12	24

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Tabela 4- Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L8

Experimento	Aeração	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NaHCO <sub>3</sub>	Intensidade de luz	Fotoperíodo
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

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

### 3.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

#### 3.3.1 Concentração de biomassa

Para determinar a concentração de biomassa seca de microalgas obtida após a filtragem, utilizou-se a equação que foi elaborada de acordo com a metodologia de ZORN (2017) e LOURES (2016), descrita no item 3.1.6.

$$[ ] = \frac{MS}{V}$$

Onde: [ ]= concentração de biomassa

Ms= Massa seca obtida

V= volume utilizado para fazer o cultivo

#### 3.3.2 Teor de lipídeo

Para determinar o potencial da microalga, foi realizada a quantificação do teor de lipídeos totais presentes na biomassa seca produzida ao final dos cultivos. O percentual de lipídeos em g/100g de biomassa foi determinado pela equação a qual foi elaborada conforme a metodologia de Bligh e Dyer (1959), descrita no item 3.1.7., e conforme a metodologia de Zorn (2017), descrita no item 3.1.8.

$$\% L = \frac{MFL}{MS} \times 100$$

Onde: %L= teor de lipídeo

MFL= massa final de lipídeos

Ms= massa de biomassa seca

### 3.3.3 Produtividade de biomassa

A produtividade é uma das maneiras de avaliar o crescimento celular é a partir dos cálculos de produtividade em biomassa dos cultivos, dessa maneira a equação abaixo foi utilizada, no qual foi elaborada de acordo com a metodologia de (ZORN, 2017; LOURES, 2016), descrita no item 3.1.6.

$$P = \frac{(F-I)}{D}$$

Onde: P= produtividade

F= valor máx atingido de crescimento celular

I= valor inicial de crescimento celular

D = dias de cultivo

### 3.3.4 Análise do perfil de ácidos graxo

Para a cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-CID) e separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo, segundo metodologia da AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS (2004). Para separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, foi utilizado um cromatógrafo a gás, modelo GC2010 fabricado pela Shimadzu, equipado com detector de ionização por chama, coluna de sílica fundida Omegawax 250 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste na velocidade de 30cm/seg. A temperatura da coluna foi de 50° C durante 2 minutos e, em seguida, elevada a 220°C numa razão de 4°C /minutos e mantida a essa temperatura por 35 minutos. As temperaturas tanto do injetor, quanto do detector foram de 250°C e 260°C, respectivamente.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho que foi realizado em quatro etapas:

- Planejamento experimental proposto para o cultivo, de acordo com o arranjo ortogonal L8 – Taguchi;
- Colheita e floculação da biomassa;
- Secagem e moagem da biomassa;
- Extração do lipídeo da biomassa.

Todas essas etapas que compuseram o trabalho, estão ilustradas no Figura 16.

Figura 16- Fluxograma que ilustra o esquema das etapas realizadas durante a execução do trabalho



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

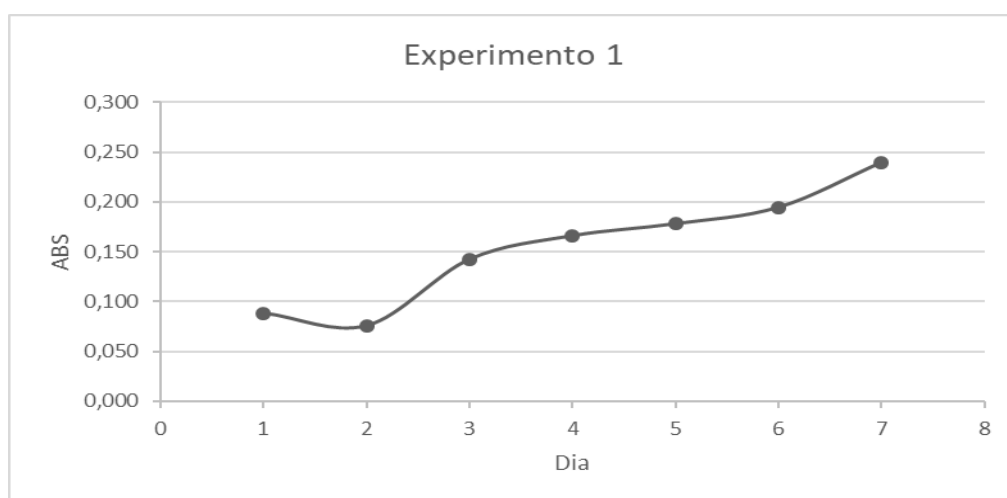


#### 4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DOS CULTIVOS

Para analisar os resultados de concentração celular da microalga, realizou-se experimentos em duplicata, os cultivos foram elaborados conforme o planejamento experimental, arranjo ortogonal de Taguchi ( $L_8$ ), para acompanhar o crescimento celular de cada cultivo, o método de contagem celular em relação aos dias de cultivo foi realizado por meio de medidas de absorvância e traçada suas respectivas curvas analíticas. De acordo com o planejamento os fatores avaliados, para os dois níveis de operação são: A: Aeração, B: Concentração de ( $\text{NO}_3$  g/L), C: Concentração de ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), D: Concentração de ( $\text{NaHCO}_3$ ), E: Intensidade luminosa, F: Fotoperíodo.

No cultivo do experimento 01, submetido a aeração 3,33 L/min, 0,50 g/L de Nitrato, 0,35 g/L de fosfato, 0,50g/L de bicarbonato de sódio, intensidade luminosa de 0,85 kluz e fotoperíodo de 12 em 12h, observou-se a máxima densidade celular no sétimo dia, conforme mostra a Figura 17.

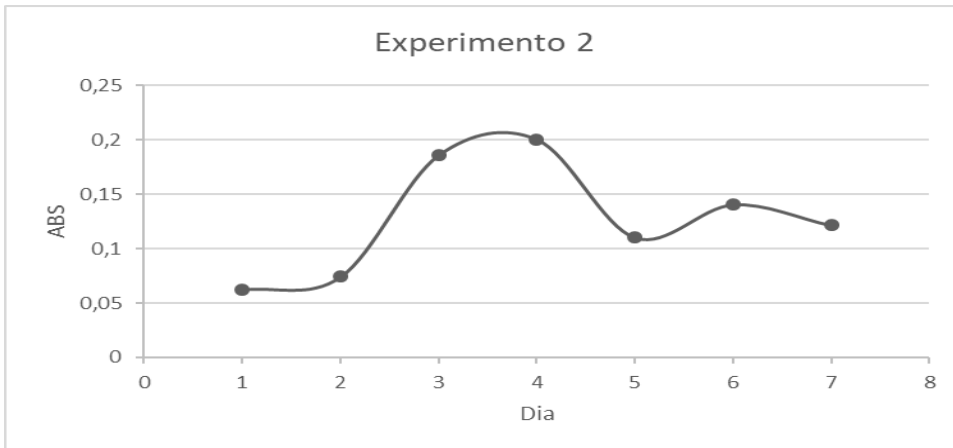
Figura 17 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 01



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 02, submetido a 3,33 L/min de aeração, 0,50 g/L de nitrato, 0,35 g/L de fosfato, 0,25g/L de bicarbonato de sódio, intensidade luminosa 14,50 kluz e fotoperíodo de 24 horas, observou-se a máxima densidade celular no terceiro dia, tal como especificado na Figura 18.

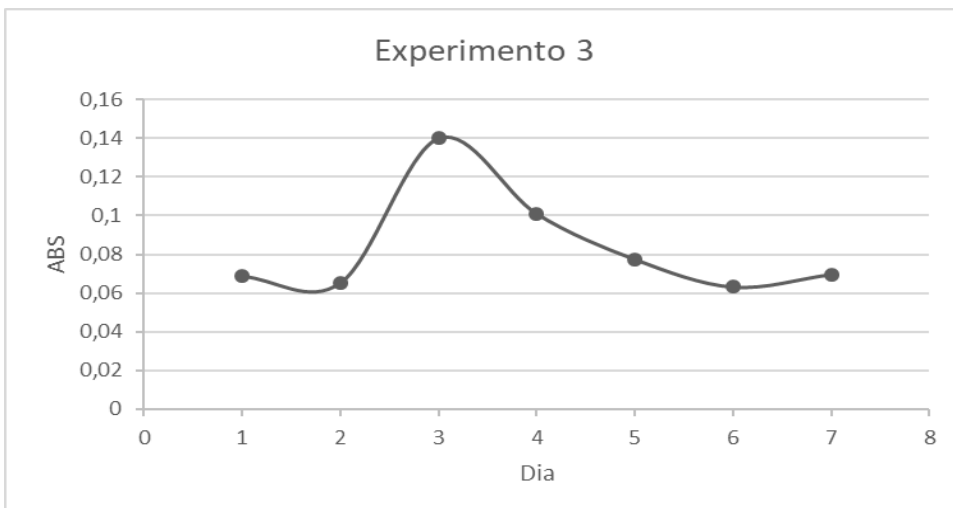
Figura 18 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 02



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 03, submetido a aeração 3,33 L/min, 0,25g/L de nitrato, 0,65 g/L de fosfato, 0,50 g/L de bicarbonato de sódio, intensidade luminosa de 0,85 kluz e fotoperíodo de 24h, observou-se na Figura 19, que houve um máximo crescimento celular no terceiro dia de cultivo.

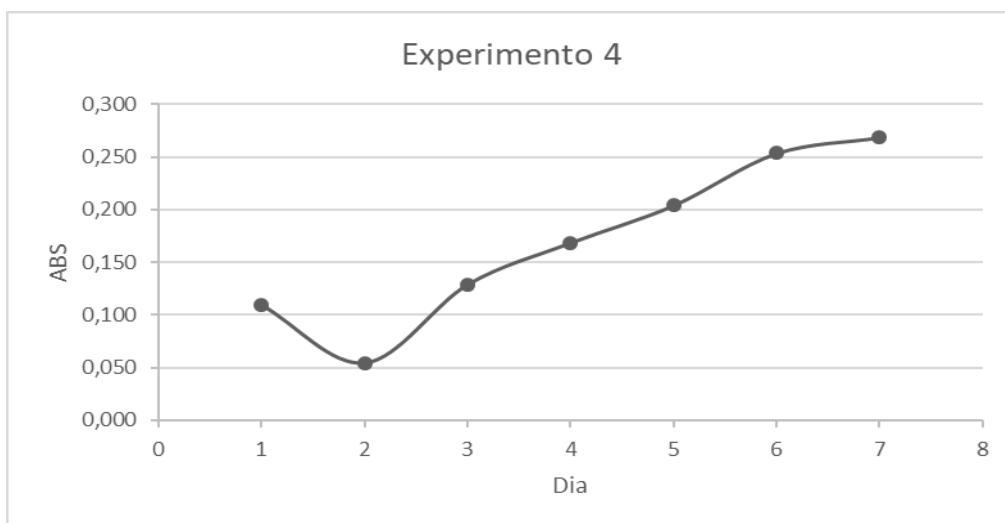
Figura 19 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 03



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 04, foi submetido a 3,33 L/min de aeração, 0,25 g /L de nitrato, 0,65 g/L de fosfato, 0,25g/L de bicarbonato de sódio, 14,50 kluz de intensidade de luz e fotoperíodo de 12 em 12h. Observou-se a máxima densidade celular no sétimo dia, conforme mostra a Figura 20.

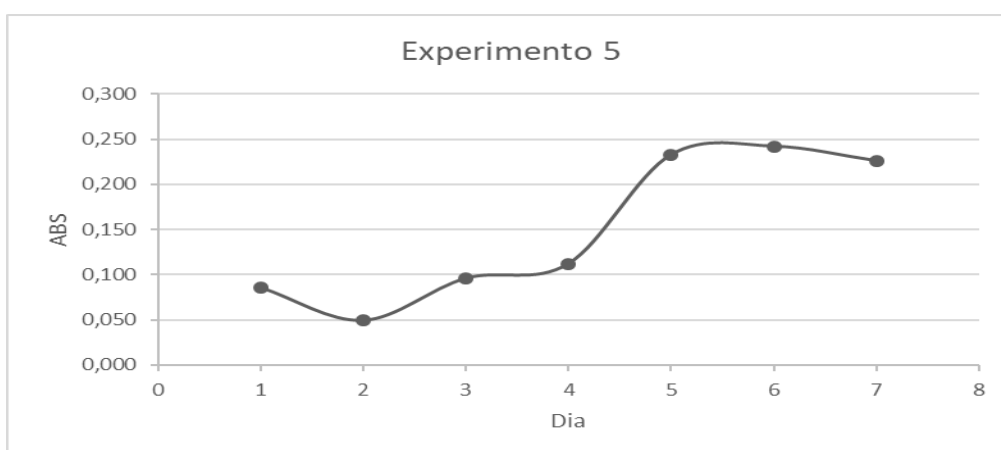
Figura 20 - Curva de crescimento celular microalgal do experimento 04



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 05, submetido a 1,67 L/min de aeração, 0,50 g/L de nitrato, 0,65 g/L de fosfato, 0,50 g/L de bicarbonato de sódio, 14,50 kluz de intensidade luminosa e um fotoperíodo de 12 em 12h. Observou-se a máxima concentração celular no quinto dia, conforme mostra a Figura 21.

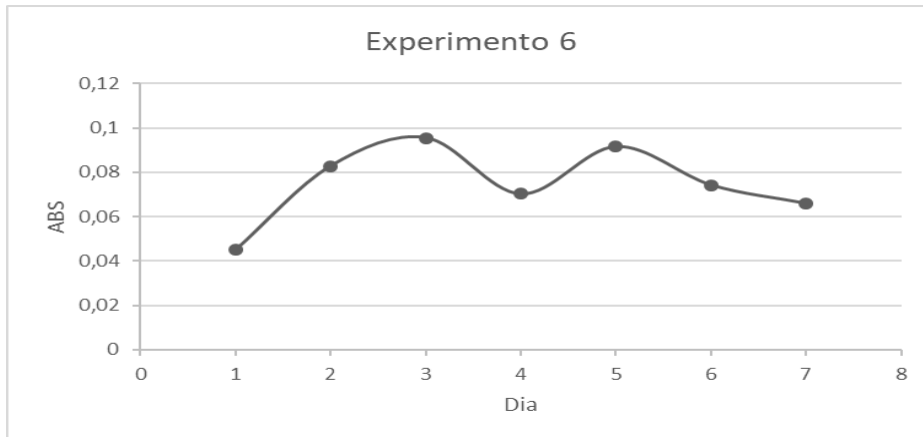
Figura 21- Curva de crescimento celular microalgal do experimento 05



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 06, submetido a 1,67 L/min de aeração, 0,50 g/L de nitrato, 0,65 g/L de fosfato, 0,25 g/L de bicarbonato de sódio, 0,85 kluz de intensidade de luz e fotoperíodo de 24h. Observou-se a máxima densidade celular no terceiro dia, como mostra a Figura 22.

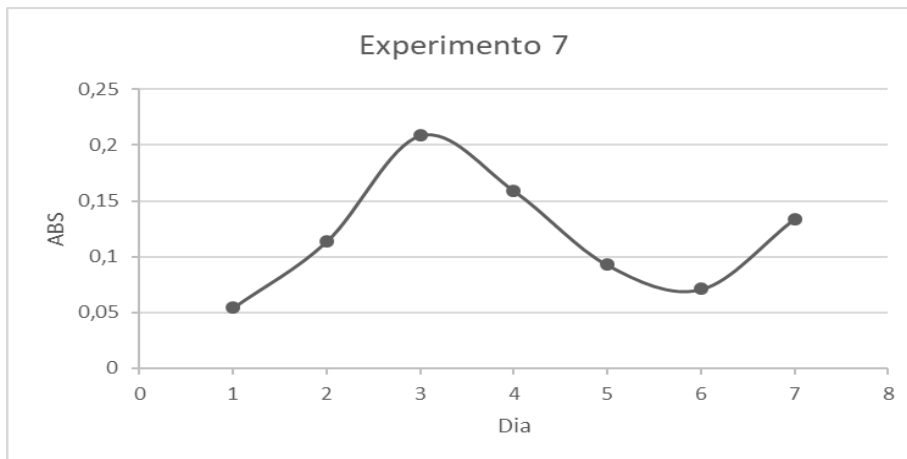
Figura 22- Curva de crescimento celular microalgal do experimento 06



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 07, submetido a 1,67 L/min de aeração, 0,25 g/L de nitrato, 0,35 g/L de fosfato, 0,50 g/L de bicarbonato de sódio, 14,50 kluz de intensidade de luz e fotoperíodo de 24h. Observou-se a máxima densidade celular no terceiro dia, tal como evidenciado na Figura 23.

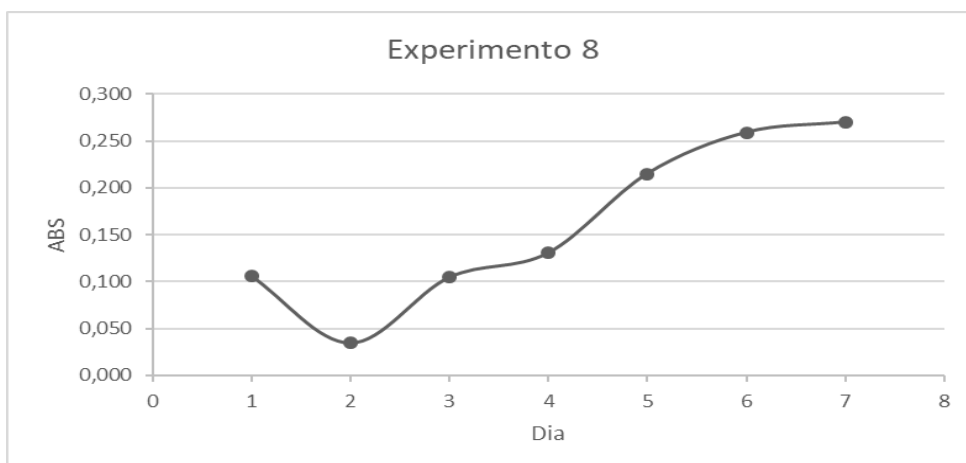
Figura 23- Curva de crescimento celular microalgal do experimento 07



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

No cultivo do experimento 08, submetido a 1,67 L/min de aeração, 0,25 g/L de nitrato, 0,35 g/L de fosfato, 0,25 g/L de bicarbonato de sódio, 0,85 kluz de intensidade de luz e fotoperíodo de 12 em 12h. Observou-se a máxima densidade celular a partir do quinto dia, como mostra a Figura 24.

Figura 24- Curva de crescimento celular microalgal do experimento



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

De acordo com os gráficos de crescimento de microalgas, abordados anteriormente pode perceber, que para cada condição de cultivo houve um dia ideal que obteve maior concentração celular. Portanto de acordo com a literatura alguns reagentes utilizados no cultivo são indispensáveis para um bom crescimento.

Amaral, (2014) obteve maior crescimento celular no 16º dia de cultivo da microalga *Chlorella sp*, quando empregou intensidade luminosa de 0,85kluz, 5% de CO<sub>2</sub>, e 0,25 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio no meio de cultivo.

#### 4.2 EFEITO DOS FATORES SOBRE A MÉDIA DA VARIÁVEL RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

Após o período de cada cultivo, tal como previsto no arranjo ortogonal de Taguchi, foi efetuada a colheita. Após a floculação ocorreu a filtração a vácuo e, em seguida, foi levado para estufa a 55° C para desidratação. Foi possível, então, construir a Tabela 5. Os fatores avaliados na matriz ortogonal de Taguchi em dois níveis de operação foram descritos da seguinte maneira: A- Aeração, B- Nitrato (NO<sub>3</sub>), C- Fosfato (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>), D- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), E- Intensidade de luz, F- Fotoperíodo.

Tabela 5- Resultados obtidos para concentração celular (Biomassa)

Experimentos	Fatores codificados						Biomassa	Média	
	A	B	C	D	E	F			
1	2	2	1	2	1	1	0,579	1,075	0,827
2	2	2	1	1	2	2	0,432	0,396	0,414
3	2	1	2	2	1	2	0,837	1,014	0,925
4	2	1	2	1	2	1	0,077	0,560	0,319
5	1	2	2	2	2	1	<b>1,876</b>	<b>0,410</b>	<b>1,143</b>
6	1	2	2	1	1	2	0,335	0,827	0,581
7	1	1	1	2	2	2	0,765	0,364	0,565
8	1	1	1	1	1	1	0,438	0,202	0,320

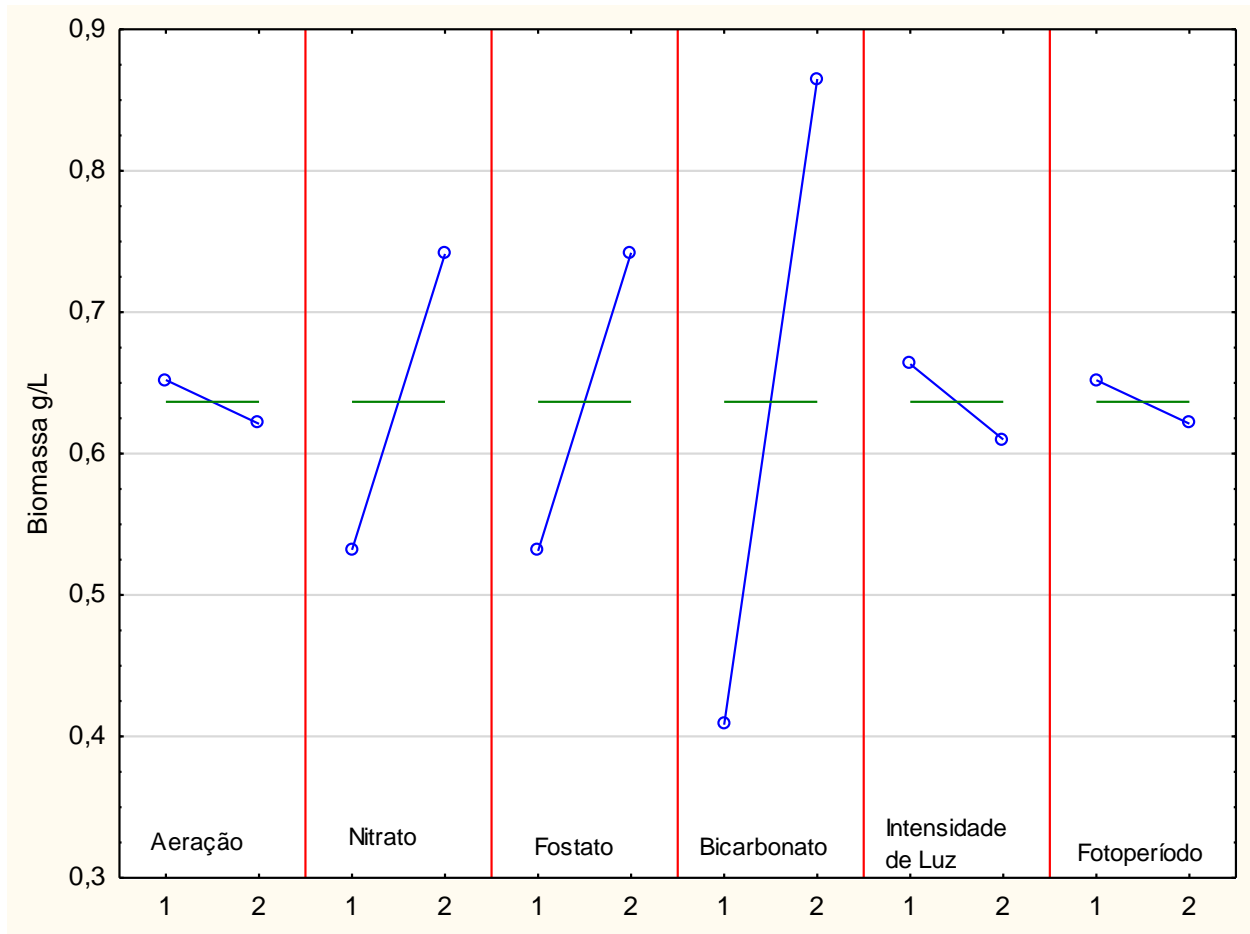
Fonte: Elaborado pela autora (2018)

De acordo com a Tabela 5, o ensaio 5 obteve melhor resultado para a concentração de biomassa algal, o qual obteve a concentração de nitrato (0,50 g/L), concentração de bicarbonato de sódio (0,50 g/L), fosfato (0,65 g/L) e fotoperíodo de 12 em 12h.

Segundo Duarte (2014), os maiores valores para o crescimento da *Chlorella* são obtidos quando as microalgas foram cultivadas utilizando carbonato de sódio como fonte de carbono. De modo semelhante, os relatos de Araújo (2005) e Chang (2012) a partir dos quais afirmam que o conteúdo de biomassa seca e o teor de lipídeo para *Chlorella vulgaris*, são maiores quando possuem o bicarbonato de sódio adicionados em seu cultivo. Para Amaral (2014), o processo de fotossíntese é significativamente relacionado com a concentração de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo e cada espécie responde distintamente para diversas concentrações de CO<sub>2</sub>.

A partir desses resultados, foi utilizado o programa MINITAB para visualizar a influência das interações sobre a variável resposta para concentração de biomassa microalgal de acordo com a Figura 25.

Figura 25 - Efeito dos fatores a variável resposta concentração de biomassa



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

De acordo com a Figura 25, são apresentados os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta. Com isso, pode-se observar a diferença de amplitude entre os níveis dos fatores.

Montgomery (2012) aponta que, quanto maior for 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. Desse modo, os maiores valores para o crescimento das microalgas foram obtidos quando as microalgas foram cultivadas utilizando bicarbonato de sódio como fonte de carbono, no nível alto desse fator.

No entanto, para obter o resultado de quais desses fatores possuem alguma significância estatística no processo da biomassa, foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA). Assim, sendo F, mostram se existiram diferenças significativas entre as médias dos fatores estudados e os valores de p denotam o grau de confiança dos resultados encontrados. Nesse caso, quanto maiores forem os valores de F calculados, mais significantes

são os fatores sobre o processo em estudo e, quanto menores forem os valores de ( $p < 0,05$ ), maior o grau de confiança, tal como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de variância para Biomassa

Fatores	Seq SS	df	Adj MS	F	P
(A)Aeração	0,003835	1	0,003835	0,021241	0,887337
(B)Nitrato	0,175080	1	0,175080	0,969779	0,350467
(C)Fosfato	0,177620	1	0,177620	0,983851	0,347167
(D)Bicarbonato	0,833706	1	0,833706	4,617960	0,060140
(E)Intensidade de luz	0,011332	1	0,011332	0,062767	0,807801
(F)Fotoperíodo	0,003788	1	0,003788	0,020984	0,888014
Residual	1,624820	9	0,180536		

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

De acordo com a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 6, obteve-se os resultados que os fatores não são significativos a nível de significância de 5%. Ocorreu esse resultado devido há alguns sinais ruídos ocorridos durante o cultivo, como por exemplo faltas de luz, assim fez com o resultado não fosse satisfatório.

#### 4.3 EFEITO DOS FATORES SOBRE A PRODUTIVIDADE DA BIOMASSA MICROALGAL

Com base nos resultados para as concentrações de biomassa microalgal, obtidas após o experimento de cada cultivo, foi determinada a produtividade de cada experimento, conforme indica a Tabela 7.



Tabela 7 - Resultados obtidos para produtividade

Experimentos	Fatores codificados						Produtividade		Média
	A	B	C	D	E	F			
1	2	2	1	2	1	1	0,031	0,019	0,025
2	2	2	1	1	2	2	0,008	0,006	0,007
3	2	1	2	2	1	2	0,012	0,024	0,018
4	2	1	2	1	2	1	0,023	0,025	0,024
5	1	2	2	2	2	1	<b>0,034</b>	<b>0,054</b>	<b>0,044</b>
6	1	2	2	1	1	2	0,007	0,006	0,007
7	1	1	1	2	2	2	0,017	0,027	0,022
8	1	1	1	1	1	1	0,017	0,027	0,022

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

A Tabela 7 evidencia que o melhor ensaio para produtividade é o 5, quando empregou o nível alto para nitrato (0,50g/L), nível alto para fosfato (0,65g/L) e nível alto para o bicarbonato de sódio (0,50g/L), aeração e fotoperíodo ambos nos níveis baixos, com os seguintes valores 1,67 L/min e 12 e 12h.

Costa (2014) encontrou resultado semelhante com maior produtividade algal e crescimento celular quando utilizou 10% de carbono nos cultivos.

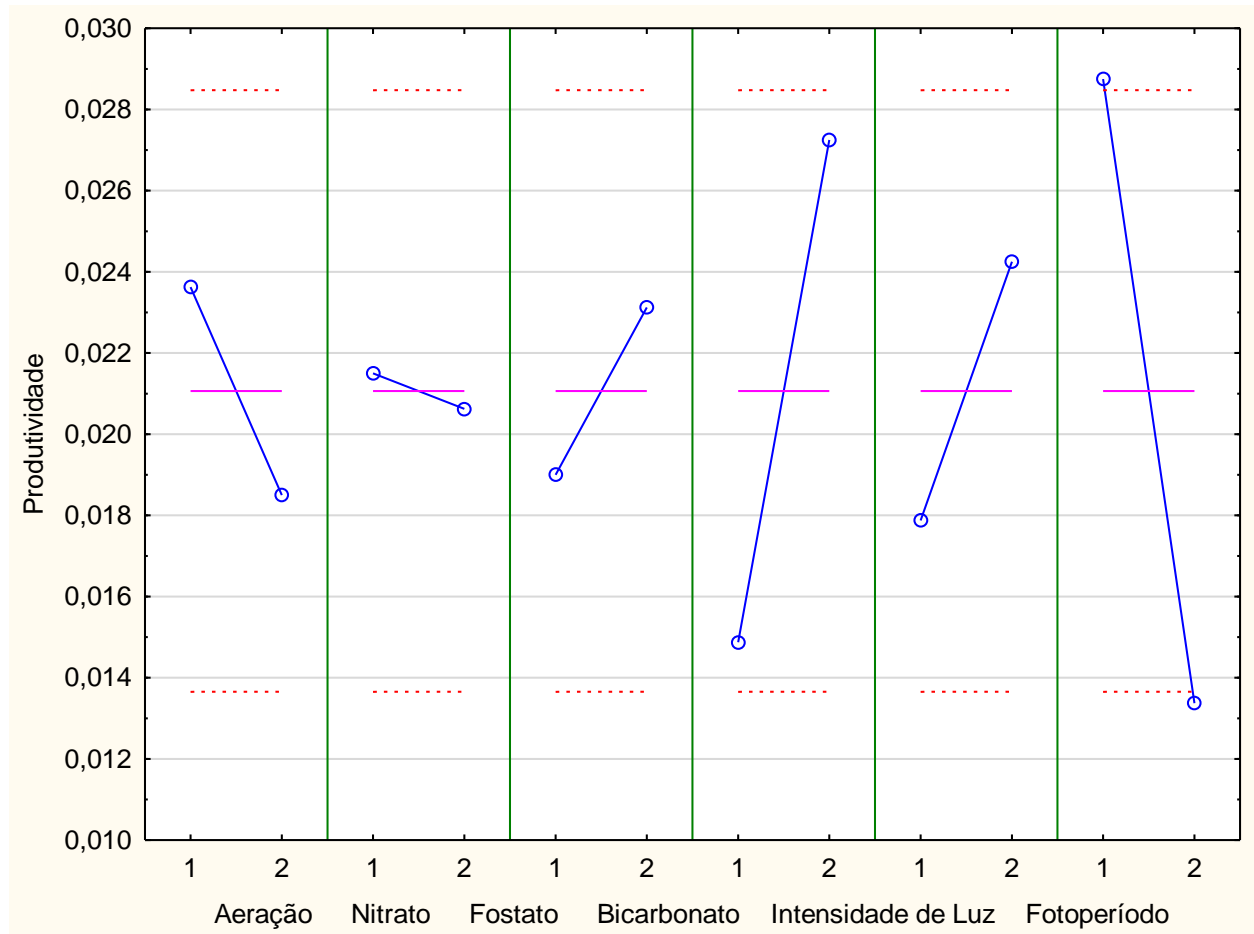
De acordo com Amaral (2014), o nitrogênio é um componente fundamental de três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, é possível verificar a tendência de aumento nas concentrações de proteínas e de clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio disponíveis são baixas, é possível identificar a diminuição marcante da taxa de divisão celular.

Para Bertoldi (2008), o cultivo de *Chlorella*, contendo  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de fosfato, apresentou 15,7% de proteína. Entretanto, com a elevação da concentração de fosfato para  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  a quantidade de proteína alcançou 37%. Assim, a quantidade de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  influencia a concentração de proteína.

No entanto, para Amaral (2014) a intensidade luminosa também influencia nos resultados de produtividade, pois a luminosidade está diretamente relacionada com o processo de fotossíntese e possui diferentes efeitos nas espécies microalgais, sendo que algumas espécies solicitam maior ou menor energia luminosa para conduzir o processo. No entanto, o excesso de luminosidade pode causar fotoinibição e morte celular. Angelo (2014) aponta os fatores como a luminosidade e aeração são indispensáveis para o cultivo de microalgas, pois afirma que uma pequena falha nesses fatores pode ter, como consequência, a diminuição da produtividade final das microalgas cultivadas, como especificado na Figura 26.

Na Figura 26 são apresentados os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta, sendo que pode ser observada uma diferença de amplitude entre os níveis dos fatores, houve destaque para intensidade luminosa e fotoperíodo ambos no nível baixo para o cultivo.

Figura 26 - Efeito dos fatores a variável resposta de produtividade



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Lopes (2018) verificou que os cultivos com menor luminosidade apresentaram uma maior fase lag, o que corresponde a um lento crescimento nos primeiros dias após o inóculo. Portanto, as microalgas mostraram uma maior produtividade de biomassa na presença de luz que na ausência. Logo, conclui que a disponibilidade de luz se apresentou como fator essencial para o desenvolvimento da microalga, sendo o tempo de 12h de luz definido como condição ideal para o cultivo em larga escala, uma vez que promoveu melhor cinética de crescimento microalgal. Esse foi o mesmo tempo de horas luz, usado nesse trabalho. A análise de variância na Tabela 8 confirma esse resultado.

Tabela 8 - Análise de variância para produtividade

Fatores	Seq SS	df	Adj MS	F	P
(A)Aeração	0,000105	1	0,000105	1,91385	0,199884
(B)Nitrato	0,000003	1	0,000003	0,05579	0,818570
(C)Fosfato	0,000068	1	0,000068	1,23985	0,294354
(D)Bicarbonato	0,000613	1	0,000613	11,15863	0,008654
(E)Intensidade de Luz	0,000163	1	0,000163	2,96129	0,119388
(F)Fotoperíodo	0,000946	1	0,000946	17,22467	0,002483
Residual	0,000494	9	0,000055		

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

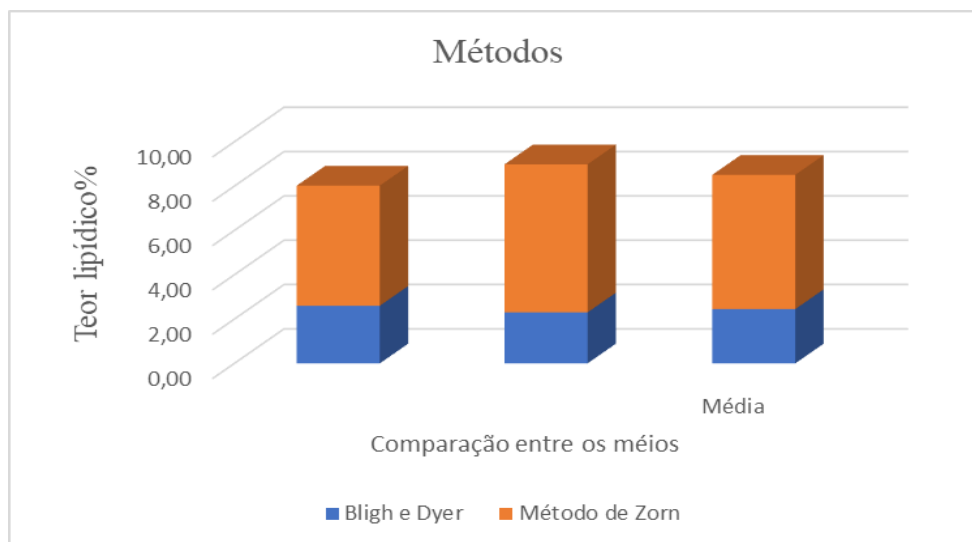
Conforme a ANOVA, apresentada na Tabela 8, o fator D (concentração de bicarbonato) e o fator F (fotoperíodo) são os mais significativos.

Para Radman, (2008) a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal e a adição de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo pode aumentar até 7 vezes a produtividade.

#### 4.4 TEOR DE LIPÍDEOS

Os lipídeos foram extraídos a partir de dois métodos o Bligh & Dyer (1959), sendo que a biomassa foi desidratada para posterior extração e o método, segundo a metodologia de Zorn (2017), a partir do qual a biomassa possuía 64% de umidade. A comparação dos resultados dos métodos está no Gráfico 1.

Gráfico 1. Comparação entre os métodos



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Os métodos foram realizados em duplicata, para cada experimento. Segundo o Gráfico 1, observa-se que o método de extração lipídica, para Zorn (2017), é aproximadamente 2,5% mais eficiente do que quando comparado ao Bligh & Dyer (1959). Os resultados para o método de Zorn (2017) podem ser confirmados a partir da Tabela 9, para o arranjo Ortogonal de Taguchi.

Tabela 9 - Respostas em duplicata para teor de lipídeo (%)

Experimentos	Fatores codificados						Teor de lipídios (%)		Média
	A	B	C	D	E	F			
1	2	2	1	2	1	1	<b>5,426</b>	<b>6,689</b>	<b>6,057</b>
2	2	2	1	1	2	2	2,268	2,409	2,338
3	2	1	2	2	1	2	1,557	1,775	1,666
4	2	1	2	1	2	1	4,369	5,480	4,925
5	1	2	2	2	2	1	5,184	5,820	5,502
6	1	2	2	1	1	2	2,606	3,149	2,877
7	1	1	1	2	2	2	3,972	3,995	3,984
8	1	1	1	1	1	1	5,424	5,966	5,695

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

A Tabela 9 mostra que o ensaio 1 obteve as melhores condições para o teor de lipídeo, que apresentou os seguintes fatores no nível alto: aeração (3,33 L/min), nitrato (0,50g/L) e bicarbonato de sódio (0,50 g/L) e os seguintes fatores apresentados no nível baixo: fosfato (0,35g/L), intensidade luminosa (0,85 kluz) e fotoperíodo (12 e 12h).

Bertoldi et al (2008) salienta que a carência de fosfato no meio produz o aumento do teor de lipídios na composição da biomassa seca. Resultado semelhante também foi encontrado nesse trabalho, pois foi utilizado baixa concentração de fosfato. Ghulam et al. (2012) obteve resultado semelhante com aumento da produção lipídica sob baixas condições de fosfato no cultivo.

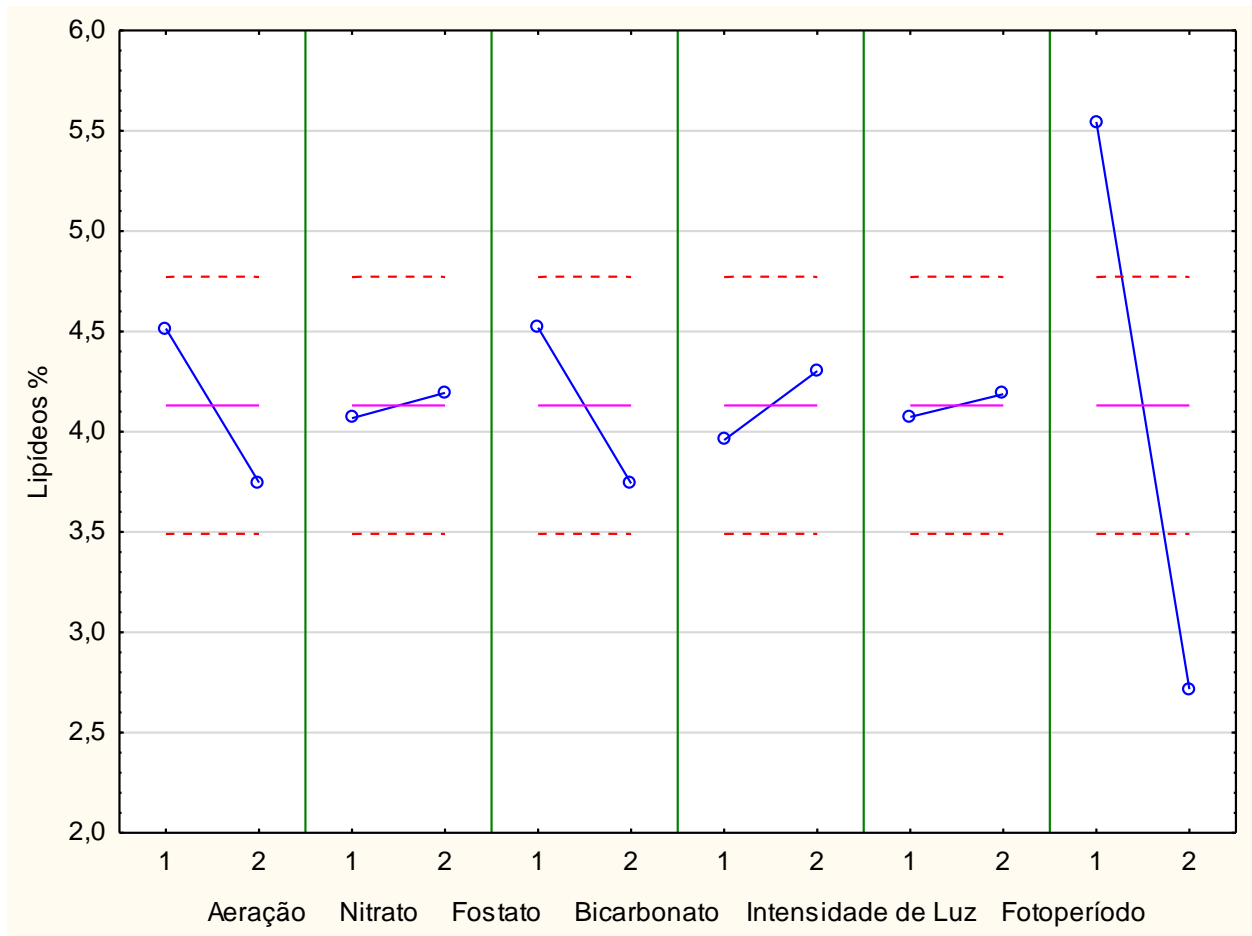
Antônio (2014) observou que com a injeção de CO<sub>2</sub> a 5%, havendo aumento na produtividade de biomassa até determinado valor, pode ocorrer aumento na produtividade lipídica, porém a concentração de 10% de CO<sub>2</sub> causa uma diminuição lipídica.

Morais et al (2008) afirma que, dependendo do gênero e espécie de microalga cultivada, a concentração de bicarbonato de sódio, no meio, pode ser variada de modo a incrementar a biossíntese de ácidos graxos saturados ou insaturados, segundo a utilização que pretende dar à biomassa formada. Assim, para a produção de biodiesel são desejáveis altas concentrações de ácidos graxos saturados.

Conforme Amaral (2014), a privação de nitrogênio estimula o acúmulo de lipídeos, fato observado na análise dos resultados, pois indicaram que, para o acúmulo de lipídeos, a concentração de nitrogênio deve operar no nível baixo. Segundo a literatura, em razão do baixo teor de nitrogênio e conteúdo de nutrientes, ocorre maior rendimento no teor de lipídeos.

A limitação desse reagente 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 (LOURES, 2016; LING, 2011). A Figura 27 apresenta os resultados para os efeitos dos fatores utilizados no cultivo.

Figura 27 - Efeito dos fatores a variável resposta concentração de lipídeo



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Na Figura 27 são apresentados os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta, sendo que pôde ser observada uma diferença de amplitude entre os níveis dos fatores e houve destaque para a aeração, bicarbonato de sódio e fotoperíodo.

Para Bertoldi et al (2008), o teor de ácidos graxos poli-insaturados produzidos pela microalga pode ser determinado pela espécie cultivada, concentração dos nutrientes do meio de cultura, fluxo de aeração, luminosidade, tempo do fotoperíodo e a temperatura do cultivo.

Tabela 10 - Análise de variância para teor de lipídeos

Fatores	Seq SS	Df	Adj MS	F	P
(A)Aeração	2,35861	1	2,35861	5,75098	0,040021
(B)Nitrato	0,06392	1	0,06392	0,15586	0,702188
(C)Fosfato	2,40913	1	2,40913	5,87416	0,038379
(D)Bicarbonato	0,47221	1	0,47221	1,15138	0,311188
(E)Intensidade de Luz	0,05143	1	0,05143	0,12540	0,731408
(F)Fotoperíodo	32,00065	1	32,00065	78,02705	0,000010
Residual	3,69110	9	0,41012		

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

De acordo com ANOVA, apresentada na Tabela 10, o fator A (aeração), o fator C (concentração de fosfato) e o fator F (fotoperíodo) são os mais significativos.

#### 4.5 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXO

A composição em ácidos graxos do material lipídico da espécie de microalga, foi analisada por cromatografia a gás. O resultado encontra-se no Quadro 3.



Quadro 3- Composição dos ácidos graxos da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* e comparação com outros autores

Ácido graxo	<i>Chlorella Vulgares</i> (presente trabalho)	<i>Chlorella Vulgaris</i> ADAMAKIS (2018)	<i>Chlorella Minutissima</i> ZORN (2017)	<i>Chlorella Minutissima</i> LOURES (2016)
<b>Saturado</b>				
<b>C 12:0</b>	0,468	...	0,19	0,16
<b>C 14:0</b>	0,235	...	0,52	0,95
<b>C 15:0</b>	1,41	...	0,13	0,21
<b>C 16:0</b>	27,72	20,32	32,37	57,11
<b>C 17:0</b>	0,373	...	0,23	0,15
<b>C 18:0</b>	1,49	1,67	3,75	5,92
<b>C 20:0</b>	1,94	...	4,02	3,31
<b>Monoinsaturado</b>				
<b>C 14:1</b>				
<b>C 16:1</b>	0,659	...	...	...
<b>C 17:1</b>	4,207	2,14	3,71	2,55
<b>C 18:1</b>	3,89	...	...	0,31
<b>C 22:1</b>	7,345	15,33	8,3	26,30
	0,403	...	...	...
<b>Poli-insaturado</b>				
<b>C 18:2</b>				
<b>C 18:3</b>	18,57	11,07	22,15	1,89
<b>N.I.</b>	16,41	30,11	1,22	0,22
	14,88	...	...	...
* N.I. Não identificado				

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Segundo o perfil de ácidos graxos no Quadro 3, foi identificada maior proporção dos ácidos graxos (27,72%) do palmítico, (7,34%) do oleico, (18,57%) do ácido linoleico e (16,41%) do ácido linolênico. Ramos et al. (2009) salienta que altas proporções de ácido palmítico (C16:0) conferem propriedades importantes associadas com as qualidades do biodiesel, como alto índice de cetano, ou seja, uma medida adimensional que indica boa qualidade da ignição do combustível.

Morais (2007) profere que as algas possuem uma grande capacidade alimentícia em razão dos elevados teores de insaturações, isto é, ácidos graxos insaturados como os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), respectivamente ômega 6 e ômega 3.

Vale ressaltar que a *Chlorella Vulgaris* cultivada a partir das condições do trabalho proposto apresentou um teor de ácido palmítico (C16:0) superior em relação aos encontrados por outros autores relacionados por meio do Quadro 3, exceto em comparação à microalga cultivada por Zorn (2017) e Loures (2016).

Loures (2016) e Zorn (2017) cultivaram a espécie *Chlorella salina* sob as condições de cultivo f/2 de Guillard adicionando CO<sub>2</sub> gasoso nas proporções de 2 a 5%. Zorn (2017) em cultivo da espécie *Chlorella minutíssima*, sob as condições do meio de cultivo f/2 de Guillard não injetou CO<sub>2</sub> gasoso ao meio de cultivo no qual obteve no total os ácidos graxos, os saturados totalizaram porcentagens variando de 37 a 45%.

Adamakis et al (2018) cultivaram *Chlorella Vulgaris* empregando meio de cultivo BBM com níveis de nitrogênio, nível alto com 15 mM de nitrogênio, nível médio com 5 mM de nitrogênio e nível baixo de nitrogênio com 0,5 mM. Esses cultivos que obtinham poucas quantidades de nitrogênio utilizaram elevada aeração para evitar o estresse de nitrato e, conseqüentemente, o aumento do pH. Ao diminuir os níveis de nitrogênio, o conteúdo lipídico aumentou substancialmente para 21,6% em peso na amostra nível médio de nitrato e 36,6% em peso na amostra que continha o nível baixo de nitrato.

Radman (2008) salienta que utilizou 12% de CO<sub>2</sub>, porém sem adição dos gases SO<sub>2</sub> e NO. Com isso, observou que as baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*, sendo que obteve 37% de conteúdo de ácido graxo saturado.

Para Francisco (2010), o teor de lipídeos da *Chlorella vulgaris* é superior quando comparado com outras espécies como *Dunaliella tertiolecta*, *Phormidium sp.*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Scenedesmus obliquus*, em geral, a produtividade e o conteúdo lipídico estão intimamente relacionados. Sendo que o conteúdo lipídico das cepas de estudadas variou de 6,3% a 27% e o melhor resultado foi para a *Chlorella vulgaris* com 27,0% e indica também que a produtividade lipídica de *C. vulgaris* pode ser aumentada em vários casos associando o desenho otimizado do fotobiorreator e um funcionamento contínuo durante o ano.

Segundo Morais (2008), dependendo do gênero e espécie de microalga cultivada, a concentração de CO<sub>2</sub> e a adição de bicarbonato de sódio, no meio, podem ser variadas de modo a incrementar a biossíntese de ácidos graxos saturados ou insaturados, levando em conta a utilização que se pretende dar para a biomassa formada. Assim, para a produção de biodiesel, em que são desejáveis altas concentrações de ácidos graxos saturados, a microalga. Já para utilização da microalga na alimentação, sendo que os altos teores de insaturados são

visados, a microalga *Chlorella vulgaris* cultivada com 12% de CO<sub>2</sub>, apresentou 72,0% de ácidos graxos insaturados.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados foi possível concluir que:

- O planejamento experimental, efetuado conforme a método de Taguchi, obteve como melhor ajuste para atingir as concentrações mais consideráveis de biomassa e teor de lipídeo;

- Quanto ao processo de extração de lipídios, dentre os métodos de extração, o que melhor atendeu às necessidades foi com o banho de ultrassom.

- A biomassa com teor de umidade de 64% atingiu rendimento mais elevado que a biomassa desidratada em estufa;

- O perfil de ácido graxo do material lipídico apresentou um resultado satisfatório, que corroborou com os relatos da literatura para a microalga *Chlorella Vulgares*, visto que apresentou ácidos graxos (27,72%) do palmítico, (7,34%) do oleico, (18,57%) do ácido linoleico e (16,41%) do ácido linolênico. O meio de cultivo BBM se mostrou adequado tanto para a obtenção de ácidos graxos favoráveis à produção de biodiesel, quanto para a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados essenciais;

- Obteve o melhor resultado para a concentração de biomassa algal, com concentração de nitrato (0,50 g/L), concentração de bicarbonato de sódio (0,50 g/L), fosfato (0,65 g/L) e fotoperíodo de 12 em 12h;

- O melhor resultado para produtividade foi o ensaio 5, quando empregou o nível alto para nitrato, nível alto para fosfato e nível alto para o bicarbonato de sódio, aeração e fotoperíodo ambos nos níveis baixos e o resultado para o teor de lipídeos foi o ensaio 1 que obteve as melhores condições para o teor de lipídeo, visto que apresentou os seguintes fatores no nível alto: aeração, nitrato e bicarbonato de sódio e os seguintes fatores que se apresentaram no nível baixo são: fosfato, intensidade luminosa e fotoperíodo.

### 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos, sugere-se:

- Cultivar as microalgas empregando outros meios de cultivo diferentes do meio BBM;
- Desenvolver o processo de extração de biomassa e lipídica com finalidades alimentícias;

- Conforme os cultivos realizados, quantificar carboidratos, proteínas, vitaminas e outros pigmentos;
- Produção de biomassa algal para obtenção de biocombustíveis.

## REFERÊNCIAS

ADAMAKIS, I. D. et al. Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 23018–23032, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2368-5> > Acesso em: 18 ago 2018.

AHMAD A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review, renewable and sustainable. **Energy Reviews**, v.15, p. 584-593, 2011. Disponível em: < [www.elsevier.com/locate/rser](http://www.elsevier.com/locate/rser) > Acesso em: 19 set 2017.

AMARAL, M, S.; ZORN, S. M. F. E.; PEDRO, G. A. Kinetics of photoautotrophic cell growth of the marine microalgae *Chlorella minutissima*: influence of white, blue and red LEDs in cultivation. **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 11, 2016. <Disponível em: [www.jmest.org](http://www.jmest.org)> Acesso em: 20 jul 2018.

AMARAL, M. S. et al. Evaluation of the cultivation conditions of marine microalgae *Chlorella sp.* to be used as feedstock in ultrasound-assisted ethanolysis. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 288–294, 2015.

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

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 5. ed. Champaign: AOCS, 2004.

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D, S; FILHO, A, C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 125-136, 2014.

ANTONY, J. et al. Multiple response optimization using Taguchi methodology and neuro-fuzzy based model. **Journal of Manufacturing Technology Management**, v. 17, p.908 – 925, 2006.

ANTONIO, P, R. **Avaliação do efeito do CO<sub>2</sub> na produção lipídica de *Chlorella Vulgaris* visando à produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Química- Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

ARAUJO, F, P. et al. Estudo da viabilidade de microalgas para produção de biodiesel. In. VII CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 2012, Piauí. **Anais...** Piauí, 2012.

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

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E; OLIVEIRA, J, L, B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 1, 2008.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917. Disponível em: < <http://www.nrcresearchpress.com>> Acesso: 30 jun 2017.

BUX, F. et al. Biodiesel synthesis from microalgal lipids using tungstated zirconia as a heterogeneous acid catalyst and its comparison with homogeneous acid and enzyme catalysts. **Fuel**,v. 187, p. 180-188, 2017. Disponível em: < [www.elsevier.com/locate/fuel](http://www.elsevier.com/locate/fuel)> Acesso: 20 out 2018.

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

CECCHI, H, M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

CHANG, J. S. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 177-181, 2012.

CHANG, J. S.; YEH, K. L. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120-127, 2012.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**, v.167, p.201-214, 2013. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)> Acesso: 12 feb 2017.

\_\_\_\_\_. Fuels from microalgae. **Biofuels 1**, p.233–235, 2010.

\_\_\_\_\_. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p.294-306, 2007. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv)> Acesso: 12 jul 2017.

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

COSTA, C, Z. **Estudo de prospecção tecnológica do “diesel renovável” como uma fonte de combustível sustentável**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

COSTA, J, A, V. Perfil de ácidos graxos das microalgas *chlorella vulgaris* e *chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimento e nutrição**, v.17, n. 4, p.429-436, 2006.

COUTTEAU, P.; CAMARA, M. R.; SORGELOOS, P. The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance and fatty acid composition of postlarval *penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 147, p. 261-273, 1996.

D'OCA, M.G.M. et al. Base/acid-catalyzed FAEE production from hydroxylated vegetable oils. **Fuel**, v. 99, p. 912–916, 2011. Disponível em: < www.elsevier.com/locate/biortech> Acesso em: 15 fev 2017.

DUARTE, J. H. et al. Cultivo de *chlorella fusca* leb 111 e *chlorella minutíssima* leb 114 isoladas de lagoas de tratamento de efluentes de origem termelétrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., São Paulo, 2014. **Anais...** São Paulo, 2014.

DZUMAN, M. J.; **Efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* para a produção de biodiesel.** 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

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.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.226, p.497, 1957.

FRANCISCO E. C. et al. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 395-403, 2010.

GAIVÃO, J. J. R. P. M. **Aplicação de diferentes metodologias na produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis sp.*** 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

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

GHULAM, M. et al. Lipid production by *Chorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvations conditions. **Bioresource technology**, v. 123, p. 279-283, 2012.

HAN, J. I. et al. Cultivation of four microalgae species in the effluent of anaerobic digester for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 738-742, 2016.

HIDALGO, P. et al. Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 179-199, 2013.

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



INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE (IEMA). **Documento de análise:** emissões dos setores de energia, processos industriais e usos de produtos (1970-2016). São Paulo: Observatório do Clima - Setor de energia e processos industriais, 2018. 90 p.

INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE (IEMA). **Documento de análise:** evolução das emissões de gases de efeito estufa no Brasil (1970-2013). São Paulo: Observatório do Clima - Setor de energia e processos industriais, 2015. 64 p.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, India, v.13 p. 2361–2372, apr. 2009.

LI, Y. et al. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 815-820, 2008.

LIU, Z.Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresour Technologic**, v. 99, p. 4717– 4722, 2007.

LOPES, T, S, A. et al. Efeitos da variação de ph e luminosidade no desenvolvimento da microalga *chlorella sp* visando à produção de biocombustíveis. In. CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS. 2018, Paraíba. Anais...Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba. 2018.

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

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

MACHADO, M, F. Cultivo de microalgas: *Chlorella sp.* e *Ankistrodesmus sp.* Chlorophyceae em água residuária suplementada com uréia e CO<sub>2</sub>. 2011. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MANDAL,S; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 281–291, 2009.

MAROUBO, L, A. **Estudo sobre a obtenção de biomassa microalgal como matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2009.

METTING, F. Biodiversity and application of microalgae. **Journal Ind Microbiol Biotech**, v. 17, p.477–489, 1996.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A.V. Perfil de ácido graxo de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, 2008.

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

MONTGOMERY, D. C. **Desing and analysis of experiments**. 8th ed. New York: Jonh Wiley and Sons, 2012.

OLIVEIRA, C. J. et al. Produção de biodiesel a partir das algas: uma revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v.3, n. esp., p.202-221, 2014.

PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v.35, n.10, p.2013-2018, 2012.

PHADKE, M. S. **Quality engineering using robust design**. New Jersey: Prentice-Hall, 1989.

RADMANN, E, M.; COSTA, J, A, V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–268, 2009.

RIOS, L. F. et al. Cultivation of three microalgae strains under mixotrophic conditions for biodiesel production. **Chemical engineering transactions**, v. 50, 2016.

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

SANTOS, A. C. M. Uso de microalgas para a produção de biodiesel: vantagens e limitações use of microalgae for biodiesel production: advantages and limitations. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, p. 23 -31, jan./jun. 2015.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas, **Revista CIATEC**, v.4, n. 1, p.48-60, 2012.

SINGH, N.; DHAR, D. Microalgae as second-generation biofuel: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.31, n. 4, p. 605-629, 2011. Disponível em: <

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

TANSEL, I.N. et al. Taguchi method–GONNS integration: complete procedure covering from experimental design to complex optimization. **Expert Systems with Applications**, v. 38, p. 4780–4789, 2011.

VIDAL, I. C. A. **Estudo da potencialidade de produção de biocombustíveis entre as microalgas *Chlorella Sp.* e *Scenedesmus Sp.* cultivadas em águas residuais**. 2016.

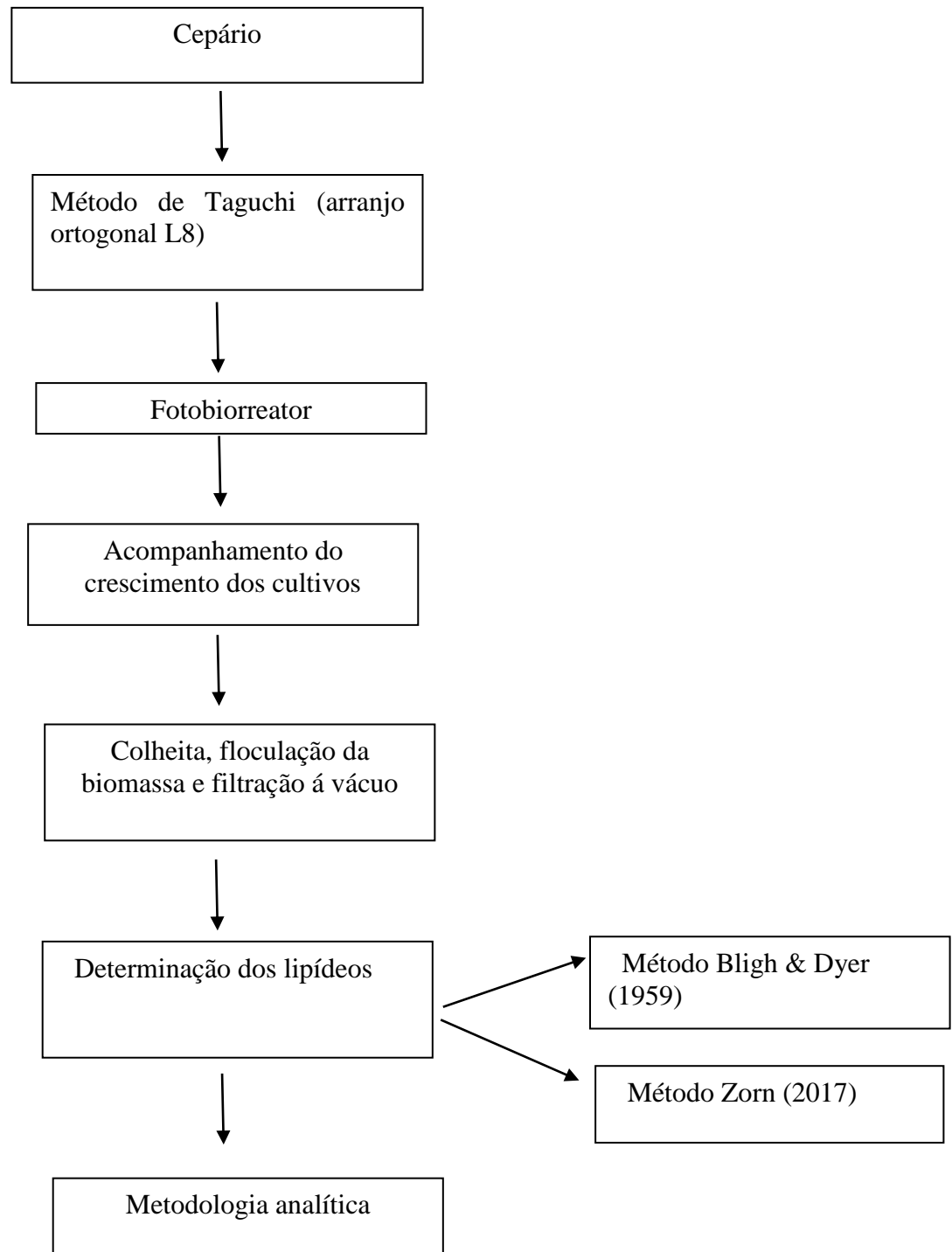
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, Campina Grande, 2016.

VIDAL, J, E, A. **Obtenção de óleo extraído da Microalga Chlorella sp.** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

VIEIRA, T. Q. **Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga Chlorella Sp. Com potencial para produção de biocombustíveis.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

ZORN, S. M. F. E. **Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

ZORN, S. M. F. E. et al. Extração de óleo microalgal por solventes orgânicos: uma alternativa para a produção de biodiesel. **Revista Janus**, v.13, p.24 2017.

**APÊNDICE 1- FLUXOGRAMA DE ETAPAS DESENVOLVIDAS NA PESQUISA**

Fonte: Elaborado pela autora (2018)