

**EDUARDO HENRIQUE BREDDA**

**Estudo comparativo e otimização da quantidade de ômega 3 e ômega 6 produzido  
pelas microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina***

**Eduardo Henrique Bredda**

**Estudo comparativo e otimização da quantidade de ômega 3 e ômega 6 produzido  
pelas microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina***

Exemplar de defesa apresentado à Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica na área de Gestão e Otimização.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Caroline Molgero Da Rós

B831e Bredda, Eduardo Henrique  
Estudo comparativo e otimização da quantidade de ômega 3 e ômega 6 produzido pelas microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina* / Eduardo Henrique Bredda – Guaratinguetá, 2019  
124 f. : il.  
Bibliografia: f. 114-124

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2019.  
Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Caroline Molgero Da Rós

1. Microalga. 2. Planejamento experimental. 3. Ácidos graxos. I. Título

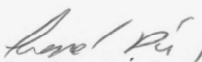
CDU 519.242(043)

**EDUARDO HENRIQUE BREDDA**


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

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA  
ÁREA: GESTÃO E OTIMIZAÇÃO

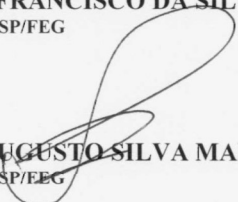
APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

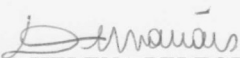
  
Prof. Dra. Ivonete Ávila  
Coordenadora

**BANCA EXAMINADORA:**

  
PROF. DR. MESSIAS BORGES SILVA  
Orientador/UNESP/FEG

  
Prof. Dr. ANEIRSON FRANCISCO DA SILVA  
UNESP/FEG

  
Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO SILVA MARINS  
UNESP/FEG

  
Prof. Dr. DANIELA HELENA PELEGRINE GUIMARÃES  
USP/EEL

  
Prof. Dr. JORGE LUIZ ROSA  
FATEC/Pindamonhangaba

Agosto de 2019

## **DADOS CURRICULARES**

### **EDUARDO HENRIQUE BREDDA**

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>NASCIMENTO</b> | 26.05.1989 – Araras / SP  |
| <b>FILIAÇÃO</b>   | Antonio Aparecido Bredda<br>Vanda Aparecida Covillo Bredda  |
| <b>2007-2012</b>  | Graduação em Engenharia Química<br>Escola de Engenharia de Lorena<br>Universidade de São Paulo                |
| <b>2013-2015</b>  | Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais<br>Escola de Engenharia de Lorena<br>Universidade de São Paulo |

Dedico este trabalho de modo especial à minha família, devido a seu apoio e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, cujo amor, apoio, confiança e dedicação foram de essencial importância no decorrer de minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Messias Borges Silva, pelo auxílio e orientação.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Caroline Molgero Da Rós, pois seu apoio e atenção foram essenciais para a execução do presente trabalho.

Aos doutorandos Wallyson Ribeiro dos Santos e Guilherme Arantes Pedro, ao mestre Victor Fernandes Marino, ao Prof. Dr. Mateus de Sousa Amaral e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Cristina Almeida Loures pelas valiosas conversas e conselhos.

Aos alunos de iniciação científica (IC). Sua passagem por nosso trabalho, embora breve, é relevante e indiscutivelmente importante para o andamento do trabalho: Alex Rezende de Souza Junior, Andressa Júlia Figueiredo dos Santos, Bruna Pereira de Arruda Santos, Gabriel Cortez da Silva, Maiara Giovana Perosine e Talitha Kühn Menezes.

Aos funcionários da oficina mecânica da Escola de Engenharia de Lorena, em especial ao Sr. Adílson José Alves da Silva, pelo suporte prestado ao longo do trabalho realizado.

Aos funcionários da pós graduação, sua dedicação auxiliou na correta condução das atividades burocráticas do trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca do Campus de Guaratinguetá pelo auxílio prestado com a aplicação das normas vigentes no presente texto escrito;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001



"Work smarter, not harder."

Carl Barks

## RESUMO

O cultivo de microalgas tem sido considerado como uma fonte promissora de lipídeos para a obtenção de ácidos graxos de alto valor agregado, como é o caso dos ômega 3 ( $\omega 3$ ) e ômega 6 ( $\omega 6$ ). O uso do planejamento de experimentos (*DOE*) permite estabelecer condições apropriadas de cultivo para as microalgas que favorece o acúmulo desses ácidos graxos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo melhorar o desempenho dos cultivos das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*, visando a produção de  $\omega 3$  e  $\omega 6$ . Primeiramente, foram avaliadas, com o uso de uma matriz ortogonal Taguchi  $L_4$ , as influências das concentrações de nitrato de sódio (de 25 a 75 mg L<sup>-1</sup>), de acetato de sódio e bicarbonato de sódio (ambas de 0 a 2 g L<sup>-1</sup>), sobre a produtividade de biomassa (Pb) e de lipídeos (Po). Como resultado, foi notado que tanto o acetato quanto o nitrato, influenciaram positivamente na Pb e na Po, para ambas as microalgas estudadas. O bicarbonato, por outro lado, não melhorou a Po, sendo excluído das etapas posteriores. Na etapa seguinte do trabalho foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central, focando no estudo da concentração de nitrato (75 a 225 mg L<sup>-1</sup>) e acetato (2 a 6 g L<sup>-1</sup>) sobre a produtividade dos cultivos. As maiores Pb obtidas foram: 188,93 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para a microalga *N. gaditana* (225 mg L<sup>-1</sup> de nitrato e 6 g L<sup>-1</sup> de acetato) e 118,93 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para a *D. salina* (150 mg L<sup>-1</sup> de nitrato e 4 g L<sup>-1</sup> de acetato). Nestas condições de cultivo, as Po foram de 22,37 e 16,03 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, para a *N. gaditana* e para a *D. salina*, respectivamente. Os óleos microalgais extraídos a partir das melhores condições de cultivo foram caracterizados quanto à viscosidade, índices de acidez e de iodo, além do perfil de ácidos graxos (AGs). O óleo da *N. gaditana* apresentou em sua composição majoritariamente os AGs C18:1 (ácido oleico), C18:2 (ácido linoleico) e C16:0 (ácido palmítico), enquanto a microalga *D. salina* obteve principalmente C18:1, C18:2, C12:0 (ácido láurico) e C16:0. A etapa final do trabalho consistiu no estudo da influência de diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ), nas faixas do azul, verde e vermelho, sobre a Po da microalga *D. salina*. A análise estatística consistiu em dois planejamentos de mistura simplex com centroide independentes, ambos utilizando 150 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, um dos quais realizado sem a adição de acetato e o outro com 4 g L<sup>-1</sup> deste nutriente no meio de cultivo. No experimento com 65% de luz azul e 35% de luz verde, 4 g L<sup>-1</sup> de acetato, obteve-se a maior Po deste estudo, 53,47 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, também resultando em um excelente teor de lipídeos, 50,89%, com os principais AGs: C16:0 (18,31%) e C18:1 (36,52%).

**PALAVRAS CHAVE:** Microalgas. *Nannochloropsis gaditana*. *Dunaliella salina*. Ômega 3. Ômega 6. Planejamento de experimentos (*DOE*).

## ABSTRACT

Microalgae cultivation has been considered as a promising lipid source for the high value polyunsaturated fatty acids, such as the omega 3 ( $\omega 3$ ) and omega 6 ( $\omega 6$ ). The design of experiments approach (DOE) can be employed to establish appropriate cultivation conditions to increase the accumulation of such fatty acids. Thus, the present work main objective was to improve the  $\omega 3$  and  $\omega 6$  productivities from *Nannochloropsis gaditana* and *Dunaliella salina* marine microalgae using design of experiments (DOE). The first step was to employ a Taguchi  $L_4$  orthogonal array, in order to evaluate the influence the concentrations of sodium nitrate (25 to 75 mg L<sup>-1</sup>), sodium acetate and sodium bicarbonate (both from 0 to 2 g L<sup>-1</sup>), have over the productivities of biomass (Pb) and lipid (Po) of the studied microalgae. As result, for both microalgae, it was observed a positive effect of the acetate and the nitrate on the Pb and the Po. Bicarbonate, on the other hand, did not increase Po. Hence, it was excluded from the succeeding experiments. In the next working stage, a 2<sup>2</sup> full factorial design was used for a focused study of the nitrate (75 to 225mgL<sup>-1</sup>) and acetate (2 to 6 g L<sup>-1</sup>) concentrations over the cultivation productivities. The greatest Pb obtained were: 188.93 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *N. gaditana* (225 mg L<sup>-1</sup> nitrate and 6 g L<sup>-1</sup> acetate) and 118.93 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *D. salina* (150 mg L<sup>-1</sup> nitrate and 4 g L<sup>-1</sup> acetate). For the same cultivation conditions, the Po obtained were 22.37 and 16.03 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for *N. gaditana* and *D. salina*, respectively. The oil obtained in the best cultivation condition for both studied microalgae were also analyzed in terms of viscosity, acid value, iodine value, and fatty acid (AG) profile. Results showed that *N. gaditana* oil was rich in terms of C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid) and C16:0 (palmitic acid). Meanwhile, *D. salina* oil contained mainly C18:1, C18:2, C12:0 (lauric acid) and C16:0. The final working step studied the influence of different light wavelengths ( $\lambda$ ), in the ranges of blue, green, and red on the *D. salina* Po. The statistical analysis consisted in two independent simplex centroid mixture designs, both using 150 mg L<sup>-1</sup> of nitrate, the first without sodium acetate, and a second with 4 g L<sup>-1</sup> of this nutrient. Using a mixture of 65% of blue and 35% of green light on the illumination, and 4g L<sup>-1</sup> of sodium acetate it was obtained the higher Po, 53.47 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, of the present work. Also resulting in an excellent lipid content, 50.89%, and the main fatty acids: C16:0 (18.31%) and C18:1 (36.52%).

**KEYWORDS:** Microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Dunaliella salina*. Omega 3. Omega 6. Design of Experiments (DOE).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Bibliometria (base de dados Scopus) para diferentes palavras chave: (a) microalgae e DOE; (b) <i>Nannochloropsis gaditana</i> e <i>Dunaliella salina</i> . -----   | 20 |
| Figura 2: Diagrama do método utilizado no trabalho. -----  | 24 |
| Figura 3: Imagens de microscopia das microalgas (a) <i>N. gaditana</i> ; (b) <i>D. salina</i> . -----  | 30 |
| Figura 4: Imagens ilustrando: (a) "raceway pond" e os fotobiorreatores: (b) placas planas; (c) domo; (d) tubular; (e) tubular helicoidal; (f) tipo tanque agitado e (g) coluna de bolhas. -----  | 32 |
| Figura 5: Esquemas ilustrativos: (a) ácido esteárico (C18:0); (b) ácido oleico (C18:1); (c) triglicerídeo; (d) fósfolípídeo. -----   | 39 |
| Figura 6: Estruturas moleculares dos ácidos graxos: (a) <i>DHA</i> ; (b) <i>EPA</i> e (c) <i>ALA</i> . -----   | 40 |
| Figura 7: Esquema ilustrativo de extração de lipídeos por solvente. -----  | 42 |
| Figura 8: Esquema de bloco ilustrando um processo genérico. -----  | 44 |
| Figura 9: Experimentos do planejamento fatorial completo $2^2$ (I-IV) com ponto central (C). -----   | 49 |
| Figura 10: Gráficos lineares mostrando duas possibilidades de interações,(a) e (b), de um planejamento $L_8$ .-----  | 51 |
| Figura 11: Planejamento de mistura simplex com centroide.-----   | 55 |
| Figura 12: Relação entre valores de r e o comportamento da função Desirability para uma $V_s$ a ser maximizada -----   | 56 |
| Figura 13: Relação entre valores de s e t e o comportamento da função Desirability para uma $V_s$ que deve ser ajustada em um valor nominal-----   | 58 |
| Figura 14: Etapas básicas dos procedimentos experimentais. -----   | 60 |
| Figura 15: Fotobiorreatores utilizados: (a) nas Etapas I e II e (b) III do cultivo-----  | 63 |
| Figura 16: Fotobiorreatores usados na 1ªetapa: (a) esquema ilustrativo; (b) fotografia.-----   | 65 |
| Figura 17: Foto dos fotobiorreatores empregados na segunda etapa do trabalho. -----  | 66 |
| Figura 18: Foto dos fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas de 10 L iluminados por LEDs nas cores: (a) azul; (b) vermelho e (c) verde. -----   | 68 |
| Figura 19: Resultados obtidos de Pb Po para as duas microalgas estudadas -----   | 73 |
| Figura 20: Gráficos dos efeitos das $V_e$ sobre a Pb (a e b) e Po (c e d) das microalgas <i>N. gaditana</i> e <i>D. salina</i> , respectivamente. -----  | 74 |
| Figura 21:Superfície de resposta para a produtividade lipídica [ $\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ] para o cultivo das microalgas <i>N. gaditana</i> (a) e <i>D. salina</i> (b) mostrando os efeitos das variáveis: acetato e nitrato.----- | 76 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 22: Gráficos dos efeitos das $V_e$ sobre a razão S/N da $P_o$ da (a) <i>N. gaditana</i> e (b) <i>D. salina</i> . -----  | 77  |
| Figura 23: Produtividade de biomassa ( $P_b$ ) obtida pelo cultivo das microalgas <i>N. gaditana</i> e <i>D. salina</i> do planejamento fatorial completo $2^2$ . -----                                | 78  |
| Figura 24: Gráfico de Pareto da $P_b$ para um nível de confiança de 95% ( $\alpha=5\%$ ) no cultivo da microalga <i>N. gaditana</i> . -----  | 79  |
| Figura 25: Perfil da produtividade de biomassa ( $P_b$ ) obtido do planejamento fatorial completo $2^2$ da <i>N. gaditana</i> ...-----   | 80  |
| Figura 26: Gráfico de Pareto da $P_b$ para um nível de confiança de 90% ( $\alpha=10\%$ ) no cultivo da microalga <i>D. salina</i> .-----  | 82  |
| Figura 27: Perfil da produtividade de biomassa ( $P_b$ ) obtido do planejamento fatorial completo $2^2$ da <i>D. salina</i> .83  |     |
| Figura 28: Resultados de $P_b$ obtidos com os cultivos da microalga <i>D. salina</i> .....   | 83  |
| Figura 29: Produtividades de biomassa ( $P_b$ ) e lipídica ( $P_o$ ) obtidas nas melhores condições de cultivo das linhagens <i>N. gaditana</i> (+,+) e <i>D. salina</i> (0,0) na segunda etapa. ----- | 85  |
| Figura 30: Gráfico da análise de viscosidade do óleo obtido nas melhores condições previstas pelo planejamento de experimentos.-----   | 88  |
| Figura 31: Perfil de AGs resultante do óleo microalgal obtido das melhores condições de cultivo das microalgas <i>N. gaditana</i> (+,+) e <i>D. salina</i> (0,0)-----                                  | 91  |
| Figura 32: Resultados da terceira etapa da <i>D. salina</i> , com relação à $P_b$ : (a) sem acetato e (b) com acetato e $P_o$ : (c) sem acetato e (d) com acetato. -----                               | 100 |
| Figura 33: Gráficos de Pareto da $P_o$ da <i>D. salina</i> em cultivos: (a) sem acetato; (b) com acetato. -----  | 101 |
| Figura 34: Modelagem obtida para a $P_o$ da <i>Dunaliella salina</i> cultivada: (a) sem acetato; (b) com acetato. -----  | 103 |
| Figura 35: Resultado do otimizador por <i>desirability</i> do Minitab para o modelo de mistura com adição de acetato -----   | 104 |
| Figura 36: (a) Resultados de $P_o$ e $P_b$ da condição C (b) Fotobiorreatores em operação na condição C (c) intervalo de confiança ( $\alpha=5\%$ ) para o valor de $P_o$ predito pelo modelo. -----   | 105 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1: Bibliometria utilizando a base de dados Scopus, realizada em 13/01/2019.....   | 19  |
| Tabela 2: Tabela com a combinação dos níveis alto (+) e baixo (-) de um arranjo fatorial $2^2$ .....   | 46  |
| Tabela 3: Exemplo hipotético de um planejamento $2^2$ para a determinação da ANOVA.....  | 47  |
| Tabela 4: Determinação da ANOVA para planejamento fatorial completo $2^k$ .....  | 48  |
| Tabela 5: Arranjo ortogonal Taguchi $L_8$ .....  | 50  |
| Tabela 6: Fatores estudados de acordo com a matriz Taguchi $L_4$ .....   | 64  |
| Tabela 7: Condições experimentais do planejamento ortogonal Taguchi $L_4$ .....  | 65  |
| Tabela 8: Variáveis de entrada (Ve) em arranjo fatorial completo $2^2$ com ponto central.....  | 66  |
| Tabela 9: Condições experimentais do planejamento fatorial completo $2^2$ com ponto central.....   | 67  |
| Tabela 10: Condições experimentais do planejamento de mistura simplex com centroide para três componentes de mistura.....  | 67  |
| Tabela 11: Resultados de Pb, Po e razão S/N da Po da <i>N. gaditana</i> da matriz ortogonal Taguchi $L_4$ .....  | 72  |
| Tabela 12: Resultados de Pb, Po e razão S/N da Po da <i>D. salina</i> da matriz ortogonal Taguchi $L_4$ .....  | 73  |
| Tabela 13: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com a matriz ortogonal Taguchi $L_4$ para o cultivo da microalga <i>N. gaditana</i> .....                                     | 75  |
| Tabela 14: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com a matriz ortogonal Taguchi $L_4$ para o cultivo da microalga <i>D. salina</i> .....                                       | 75  |
| Tabela 15: Produtividade de biomassa (Po) obtida pelo cultivo das microalgas <i>N. gaditana</i> e <i>D. salina</i> do planejamento fatorial completo $2^2$ .....                           | 77  |
| Tabela 16: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial completo $2^2$ da Pb da segunda etapa da <i>N. gaditana</i> .....                                 | 80  |
| Tabela 17: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial completo $2^2$ da Pb da segunda etapa da <i>D. salina</i> .....                                   | 82  |
| Tabela 18: Produtividades de biomassa (Pb) e lipídica (Po) obtidas nas melhores condições de cultivo das linhagens <i>N. gaditana</i> (+,+) e <i>D. salina</i> (0,0) na segunda etapa..... | 84  |
| Tabela 19: Propriedades físico-químicas dos óleos obtidos nas melhores condições de cultivo de acordo com o planejamento fatorial $2^2$ .....  | 89  |
| Tabela 20: Resultados de Pb e Po da <i>D. salina</i> do planejamento de mistura simplex.....   | 99  |
| Tabela 21: Análise de ANOVA do planejamento de mistura simplex da <i>D. salina</i> sem acetato no meio de cultivo.....   | 101 |
| Tabela 22: Análise de ANOVA do planejamento de mistura simplex da <i>D. salina</i> com acetato no meio de cultivo.....   | 101 |
| Tabela 23: Perfil de AGs da <i>D. salina</i> do planejamento de mistura com acetato de sódio.....  | 108 |

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Valores de Pb e Po encontrados na literatura para as microalgas *N. gaditana* e *D. salina* empregando diferentes condições de cultivo. -----86
- Quadro 2: Teor dos principais AGs obtidos da literatura com relação a microalga *N. gaditana*.  
-----92
- Quadro 3: Teor dos principais AGs obtidos da literatura com relação a microalga *D. salina*. 94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| A                  | Luz Azul   |
| AG                 | Ácido Graxo  |
| ALA                | Ácido $\alpha$ -Linolênico (do inglês “ <i><math>\alpha</math>-Linolenic Acid</i> ”) |
| ANOVA              | Análise de Variância (do inglês “ <i>Analysis of Variance</i> ”)                     |
| CG                 | Cromatografia Gasosa   |
| <i>D. salina</i>   | <i>Dunaliella salina</i>   |
| DHA                | Ácido Docosaheptaenoico (do inglês “ <i>Docosaheptaenoic Acid</i> ”)                 |
| EPA                | Ácido Eicosapentaenoico (do inglês “ <i>Eicosapentaenoic Acid</i> ”)                 |
| FAME               | Ácidos Graxos Metilados (do inglês “ <i>Fatty Acid Methyl Ester</i> ”)               |
| <i>N. gaditana</i> | <i>Nannochloropsis gaditana</i>  |
| PUFA               | Ácido Graxo Poli-insaturado (do inglês “ <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i> ”)        |
| S/N                | Razão Sinal Ruído (do inglês “ <i>Signal to Noise Ratio</i> ”)                       |
| Vd                 | Luz Verde  |
| Ve                 | Variável de entrada  |
| Vm                 | Luz Vermelha   |
| Vs                 | Variável de saída  |



## LISTA DE SÍMBOLOS

|                           |  |
|---------------------------|--|
| $\lambda$                 | Comprimento de onda                              |
| $\text{CH}_3\text{COONa}$ | Acetato de sódio                                 |
| $\text{CO}_2$             | Gás carbônico                                    |
| F                         | Teste F  |
| $f_o$                     | Fração de óleo obtida em relação à biomassa seca |
| $f_s$                     | Fração seca na biomassa                          |
| Gl                        | Graus de Liberdade                               |
| Ia                        | Índice de acidez                                 |
| Ii                        | Índice de iodo                                   |
| $\text{NaNO}_3$           | Nitrato de sódio                                 |
| P                         | p-valor  |
| Pb                        | Produtividade de biomassa                        |
| Po                        | Produtividade de óleo (lipídeos)                 |
| QM                        | Quadrados médios                                 |
| SQ                        | Soma dos Quadrados                               |
| $\nu$                     | Viscosidade cinemática                           |
| $\omega_3$                | Ômega 3  |
| $\omega_6$                | Ômega 6  |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS</b> .....   | <b>18</b> |
| 1.1          | CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA .....   | 18        |
| 1.2          | RELEVÂNCIA CIENTÍFICA E JUSTIFICATIVA.....   | 18        |
| 1.3          | QUESTÕES DE PESQUISA E OBJETIVOS .....   | 22        |
| 1.4          | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 22        |
| 1.5          | DELIMITAÇÃO DA PESQUISA .....  | 23        |
| 1.6          | ESTRUTURA DO TRABALHO .....  | 25        |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SISTEMÁTICA</b> .....   | <b>26</b> |
| 2.1          | MICROALGAS.....  | 26        |
| <b>2.1.1</b> | <b>Microalgas estudadas</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>2.1.2</b> | <b>Cultivo e colheita das microalgas</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>2.1.3</b> | <b>Lipídeos, Ômega 3 e 6 (<math>\omega</math>3 e <math>\omega</math>6)</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>2.1.4</b> | <b>Extração de lipídeos</b> .....  | <b>41</b> |
| 2.2          | PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS ( <i>DOE</i> ).....   | 44        |
| <b>2.2.1</b> | <b>Fatorial completo <math>2^k</math></b> .....  | <b>45</b> |
| <b>2.2.2</b> | <b>Matrizes ortogonais Taguchi</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>2.2.3</b> | <b>Planejamento de mistura</b> .....   | <b>54</b> |
| 2.3          | FUNÇÃO DESIRABILITY .....  | 55        |
| <b>3</b>     | <b>DESCRIÇÃO E MODELAGEM DO PROBLEMA</b> .....   | <b>59</b> |
| 3.1          | LINHAGENS DE MICROALGAS .....  | 59        |
| 3.2          | MEIOS DE CULTIVO E PROCESSOS DE DESINFECÇÃO DOS FOTOBIOREATORES .....  | 59        |
| 3.3          | ETAPAS DOS CULTIVOS DAS MICROALGAS.....  | 59        |
| 3.4          | PREPARO DOS INÓCULOS E AJUSTE DE ABSORBÂNCIA .....   | 62        |
| 3.5          | CULTIVOS .....   | 63        |
| <b>3.5.1</b> | <b>Etapa I: Estudo da influência da fonte de carbono na produtividade celular e lipídica de microalgas</b> .....   | <b>63</b> |
| <b>3.5.2</b> | <b>Etapa II: Estudo da concentração de acetato e nitrato de sódio no cultivo das microalgas <i>Nannochloropsis gaditana</i> e <i>Dunaliella salina</i></b> ..... | <b>65</b> |
| <b>3.5.3</b> | <b>Etapa III: Estudo de diferentes comprimentos de onda (<math>\lambda</math>) como fonte de iluminação no cultivo das microalgas</b> .....                      | <b>67</b> |

|                |   |            |
|----------------|---|------------|
| 3.6            | COLHEITA DA BIOMASSA .....  | 69         |
| 3.7            | EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS .....   | 69         |
| 3.8            | CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL LIPÍDICO .....   | 70         |
| 3.9            | ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....   | 71         |
| <b>4</b>       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>72</b>  |
| 4.1            | ETAPA I: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA<br>PRODUTIVIDADE CELULAR E LIPÍDICA DAS MICROALGAS.....  | 72         |
| 4.2            | ETAPA II: ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ACETATO E NITRATO DE<br>SÓDIO NO CULTIVO DAS MICROALGAS <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i> E<br><i>DUNALIELLA SALINA</i> ..... | 77         |
| <b>4.2.1</b>   | <b>Análise estatística dos resultados de produtividade de biomassa da microalga<br/><i>Nannochloropsis gaditana</i> .....</b>                                   | <b>78</b>  |
| <b>4.2.2</b>   | <b>Análise estatística dos resultados de produtividade de biomassa da microalga <i>D.</i><br/><i>salina</i> .....</b>   | <b>81</b>  |
| <b>4.2.3</b>   | <b>Extração e caracterização do óleo microalgal obtido nas melhores condições<br/>preditas pelo planejamento fatorial.....</b>                                  | <b>84</b>  |
| <i>4.2.3.1</i> | <i>Índice de iodo, viscosidade, teor de ácidos graxos livres e índice de acidez .....</i>   | <i>91</i>  |
| 4.3            | ETAPA III: ESTUDO DE DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) COMO<br>FONTE DE ILUMINAÇÃO NO CULTIVO DAS MICROALGAS .....                                  | 98         |
| <b>5</b>       | <b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA FUTURAS PESQUISAS.....</b>   | <b>110</b> |
| 5.1            | VERIFICAÇÃO DOS OBJETIVOS E RESPOSTAS ÀS QUESTÕES DE PESQUISA<br>110  |            |
| 5.2            | CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO .....   | 111        |
| 5.3            | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....  | 111        |
|                | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>112</b> |

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

Algumas espécies de microalgas acumulam elevado teor de lipídeos no interior de suas células, especialmente quando cultivadas em um meio com baixa concentração de nitrogênio (BERNARD, 2011; BWAPWA; ANANDRAJ; TROIS, 2017; PULZ; GROSS, 2004). Este lipídeo de alta qualidade pode ser empregado como matéria-prima em diversas áreas, desde a produção de biodiesel até a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3,  $\omega$ 3, e 6,  $\omega$ 6), de elevado valor agregado.

Existem diversas vantagens no cultivo de microalgas para a produção de lipídeos, dentre as quais podem ser listadas: não necessidade de terras agricultáveis, alta taxa de crescimento, tolerância a ambientes com elevada concentração de CO<sub>2</sub>, possibilidade de cultivo em água de efluentes industriais e domésticos reduzindo sua concentração de nitrogênio, Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), ou até mesmo de metais pesados como o arsênio, ou em água do mar (economizando água potável), além de serem mais eficientes na captura da energia solar em comparação com plantas terrestres (BWAPWA; ANANDRAJ; TROIS, 2017; GE *et al.*, 2016; JAZZAR *et al.*, 2015). Apesar das vantagens apresentadas, o cultivo de microalgas ainda apresenta elevado custo para que possa ser economicamente atrativo para a produção de biocombustíveis (LEU; BOUSSIBA, 2014; LIU, 2016; SAWAENGSAK *et al.*, 2014).

Uma possível solução para esta questão econômica seria a obtenção de produtos de elevado valor agregado, como é o caso dos ômega 3 ( $\omega$ 3) e 6 ( $\omega$ 6), por exemplo. Estes compostos são valiosos produtos na indústria farmacêutica e cosmética. Sabe-se, inclusive, que a ingestão destes ácidos graxos, considerados essenciais, pode proporcionar diversos benefícios à saúde humana, com efeitos positivos sobre o sistema cardiovascular, cognição, formação cerebral do bebê durante a gravidez e no período pós-natal, melhora de doenças relacionadas à idade como Alzheimer e degeneração muscular, dentre outros benefícios (CUSTÓDIO *et al.*, 2014; SELVAKUMAR; UMADEVI, 2014).

## 1.2 RELEVÂNCIA CIENTÍFICA E JUSTIFICATIVA

Para a análise dos dados bibliométricos obtidos foram criados a Tabela 1 e a Figura 1. A Tabela 1 mostra o número total de publicações feitas desde 1990 até a data da realização da

pesquisa (13/01/2019) com o uso de diversas palavras chave na base de dados Scopus (“Scopus”, 2019). As palavras chave da pesquisa foram delimitadas ao título, resumo e palavras chave do artigo, exceto para as pesquisas marcadas com asterisco, vide Tabela 1. Nas pesquisas usando as palavras chave “*Dunaliella salina*” e “*Nannochloropsis gaditana*”, os resultados foram restritos aos artigos com a palavra chave no título. O uso deste filtro buscou garantir o retorno apenas de artigos com resultados pertinentes às espécies de microalga estudadas.

Tabela 1: Bibliometria utilizando a base de dados Scopus, realizada em 13/01/2019<sup>1</sup>.

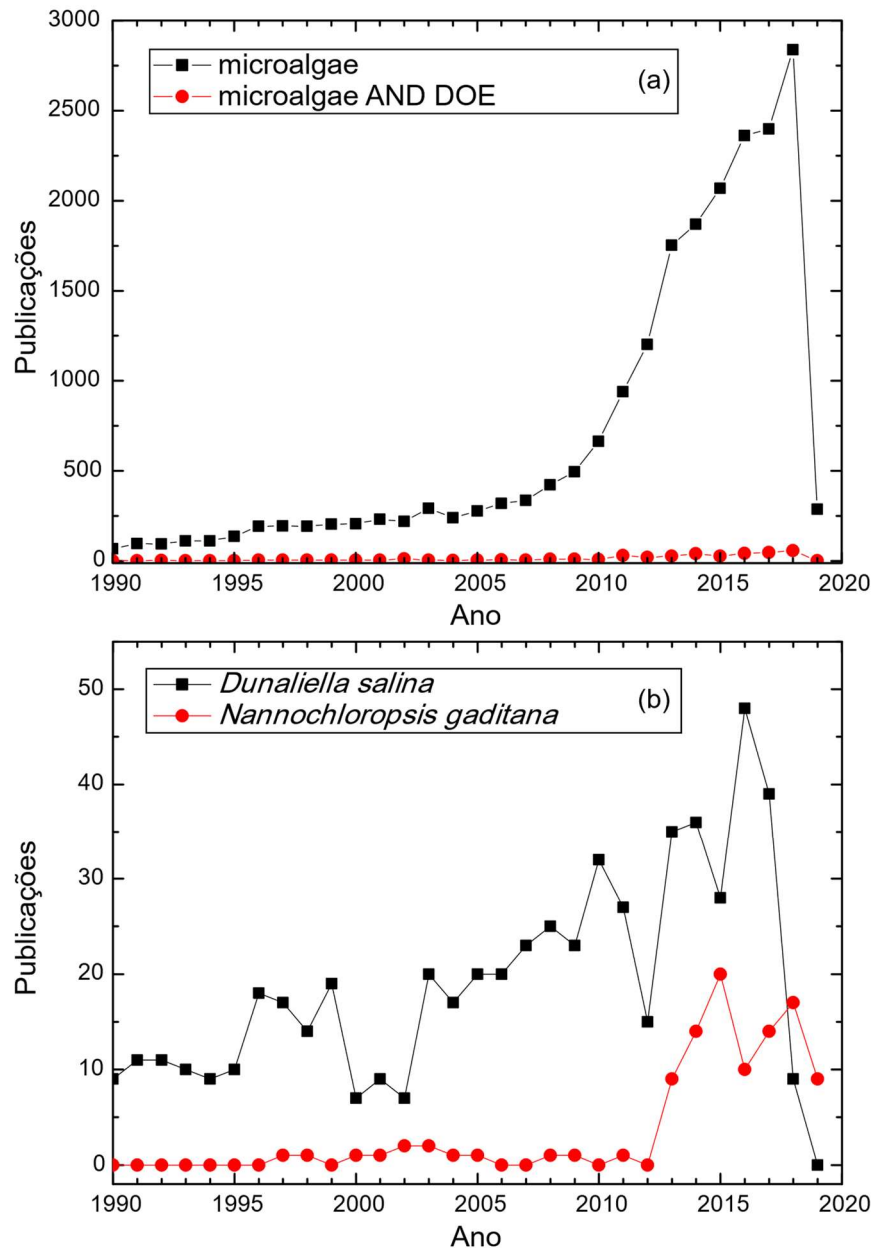
| Palavras chave   | Publicações |
|--|-------------|
| <i>microalgae</i>                                      | 20.827      |
| <i>Dunaliella salina</i> *                             | 568         |
| <i>microalgae AND DOE</i>                              | 405         |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> *                      | 106         |
| <i>microalgae AND sodium bicarbonate</i>               | 69          |
| <i>microalgae AND sodium acetate</i>                   | 45          |
| <i>Nannochloropsis gaditana AND FAME</i>               | 21          |
| <i>Dunaliella salina AND response surface</i>          | 14          |
| <i>Nannochloropsis gaditana AND response surface</i>   | 10          |
| <i>Dunaliella salina AND FAME</i>                      | 7           |
| <i>Dunaliella salina AND sodium bicarbonate</i>        | 6           |
| <i>Microalgae AND mixture design</i>                   | 4           |
| <i>Nannochloropsis gaditana AND sodium bicarbonate</i> | 1           |
| <i>Dunaliella salina AND Taguchi</i>                   | 0           |
| <i>Nannochloropsis gaditana AND Taguchi</i>            | 0           |
| <i>Dunaliella salina AND mixture design</i>            | 0           |
| <i>Dunaliella salina AND sodium acetate</i>            | 0           |
| <i>Nannochloropsis gaditana AND sodium acetate</i>     | 0           |

Fonte: Scopus (2019).

<sup>1</sup> As palavras chave foram buscadas no título, resumo e palavras chave dos artigos. A busca com as palavras marcadas com asteriscos foi restrita ao título dos artigos. Os artigos considerados foram àqueles publicados na base de dados Scopus desde 1990 até o momento da pesquisa.

A Figura 1 (a) ilustra o número de publicações, em função do ano, quando se emprega as palavras chave “*microalgae*” e “*microalgae AND DOE*” restritas ao título, resumo e palavras chave do artigo. A Figura 1 (b), utiliza as palavras chave “*Dunaliella salina*” e “*Nannochloropsis gaditana*” restritas ao título do artigo.

Figura 1: Bibliometria (base de dados Scopus) para diferentes palavras chave: (a) *microalgae* e *DOE*; (b) *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*.



Fonte: Scopus (2019).

Analisando os dados da literatura, percebe-se grande aumento, com o passar dos anos, na quantidade de material publicado com relação às microalgas, vide Figura 1 (a). Com especial

destaque a partir de 2010, quando a incidência de publicações com a palavra chave “*microalgae*” aumenta de forma significativa. Contudo, comparado ao número de publicações sobre as microalgas, há relativamente poucos trabalhos de microalgas que usam ferramentas estatísticas de planejamento de experimentos (*DOE*). Percebe-se isto na Figura 1(a), e na Tabela 1, que mostra um número relativamente pequeno para a pesquisa com as palavras chave “*microalgae AND DOE*”, em relação ao uso da palavra chave “*microalgae*”, para os mesmos parâmetros de pesquisa. Outro fator relevante é o fato de a maior parte dos artigos referentes às palavras chave “*microalgae AND DOE*” serem datados a partir de 2008 (325 dos 425 totais). Isto mostra que o uso das ferramentas de planejamento de experimento (*DOE*), neste campo do conhecimento, é relativamente recente.

Com relação às espécies de microalgas estudadas, a Figura 1(b) ilustra um aumento no número de publicações ao longo do tempo para ambas às espécies. Destas, a *D. salina* vem sendo estudada há mais tempo em relação à *N. gaditana*, cujas pesquisas se intensificam principalmente a partir de 2012. Ao serem pesquisadas as espécies de microalgas com a palavra chave “*response surface*”, ferramenta de *DOE*, poucos artigos são retornados (14 para a *D. salina* e 10 para a *N. gaditana*). Destes, exceto um, todos são publicados a partir de 2012, mostrando novamente o uso recente de tal ferramenta. Quando se pesquisou a espécie da microalga e a palavra chave “Taguchi”, por outro lado, não houve retorno de artigos pela base de dados. A ferramenta de *DOE* de planejamento de mistura também é pouco explorada, sendo 4 artigos encontrados para a pesquisa “*microalgae AND mixture design*” e nenhum encontrado para as palavras chave “*Dunaliella salina AND mixture design*” até o momento da pesquisa.

Com relação ao estudo dos comprimentos de onda sobre a produtividade das microalgas estudadas (*N. gaditana* e *D. salina*), foram encontrados dois artigos, que serão apresentados e discutidos posteriormente, contudo estes não apresentam estudo detalhado e sistemático com o uso de *DOE* ou perfis de ácido graxos FAMES.

O acetato de sódio, escolhido como fonte de carbono também é pouco estudado. Para as pesquisas utilizando como palavras chave “*Nannochloropsis gaditana AND sodium acetate*” e “*Dunaliella salina AND sodium acetate*” não houve resultados. Quando se expande a pesquisa para “*microalgae AND sodium acetate*” retornam 45 resultados, mostrando a importância de tal fonte de carbono. Destes, a maioria é datada a partir de 2013 (37), mostrando que o tema é recente. “*microalgae AND sodium bicarbonate*”, por sua vez retornaram 69 resultados, maioria a partir de 2010 (68), (nutriente mais estudado).

### 1.3 QUESTÕES DE PESQUISA E OBJETIVOS

- Questões de pesquisa
  - Qual a relação que existe entre as condições de cultivo empregadas para as microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina* com a produtividade de lipídeos e o perfil de ácidos graxos do óleo obtido?
  - Como o comprimento de onda da luz utilizado na iluminação dos fotobiorreatores durante o cultivo influencia no crescimento celular, produtividade de lipídeos e perfil de ácidos graxos do óleo microalgal?
- Objetivo principal:
 

Determinar a relação que existe entre o ajuste de parâmetros de cultivo e a produtividade celular, produtividade lipídica e de ômega 3 e 6 das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*.
- Objetivos específicos:
  - Comparar a eficiência de duas fontes de carbono (acetato de sódio e bicarbonato de sódio) na produção de lipídeos, ômega 3 e 6 ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*;
  - Avaliar a influência da concentração da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio, utilizadas no meio de cultivo, sobre a produtividade das microalgas;
  - Avaliar a influência do comprimento de onda da luz,  $\lambda$ , utilizado no cultivo das microalgas sobre a produtividade de biomassa celular e lipídica, bem como no perfil de ácidos graxos da microalga *Dunaliella salina*.

### 1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

De acordo com Bertrand; Fransoo (2002) e Miguel *et al.* (2012), o enquadramento do método de pesquisa desse trabalho pode ser descrito como:

- Abordagem: quantitativa
- Natureza: aplicada
- Objetivos: empírico descritivos
- Método: experimentação e modelagem
- Técnicas empregadas: análise de experimentos e modelagem computacional



A abordagem do presente trabalho é de modelagem quantitativa devido à preocupação com a construção de modelos matemáticos que, em parte, explicam o comportamento e a relação de causalidade de variáveis de um problema real. Esta relação de causalidade pode ser identificada como o ajuste de uma variável independente  $x$  provocando mudanças quantitativas em uma variável dependente  $f(x)$  (BERTRAND; FRANSOO, 2002; MIGUEL *et al.*, 2012). No caso do presente trabalho, buscou-se a determinação de modelos que relacionavam parâmetros de cultivo (variáveis de entrada/independentes,  $V_e$ ) com a produtividade de biomassa e de lipídeos das microalgas (variáveis de saída/dependentes,  $V_s$ ).

De um modo geral, as pesquisas de modelagem quantitativas podem ser divididas em duas classes: axiomáticas e empíricas. A pesquisa axiomática pode ser subdividida em descritiva e normativa. A área mais frequente, pesquisa axiomática normativa, busca informações da literatura, relações de causalidade entre variáveis, e aplica este conhecimento na resolução de um problema novo. Outra possibilidade envolve a comparação de diversas estratégias, embasadas na literatura, para a aplicação em um novo problema (BERTRAND; FRANSOO, 2002).

Ao contrário do que se trabalha em pesquisa axiomática, no presente trabalho foram feitos experimentos, em situações controladas, para a obtenção de dados numéricos ( $V_s$ : produtividades de biomassa,  $P_b$ , e lipídeos,  $P_o$ ). Estes dados foram, então, apropriadamente analisados em softwares estatísticos. Destas análises foram determinados modelos que buscam retratar a realidade observada sobre o cultivo das microalgas. Estes modelos verificam a relação de causalidade das  $V_e$  (parâmetros de cultivo) com as de saída (produtividade do cultivo). Com isto, tem-se que a pesquisa é empírica descritiva (BERTRAND; FRANSOO, 2002; MIGUEL *et al.*, 2012).

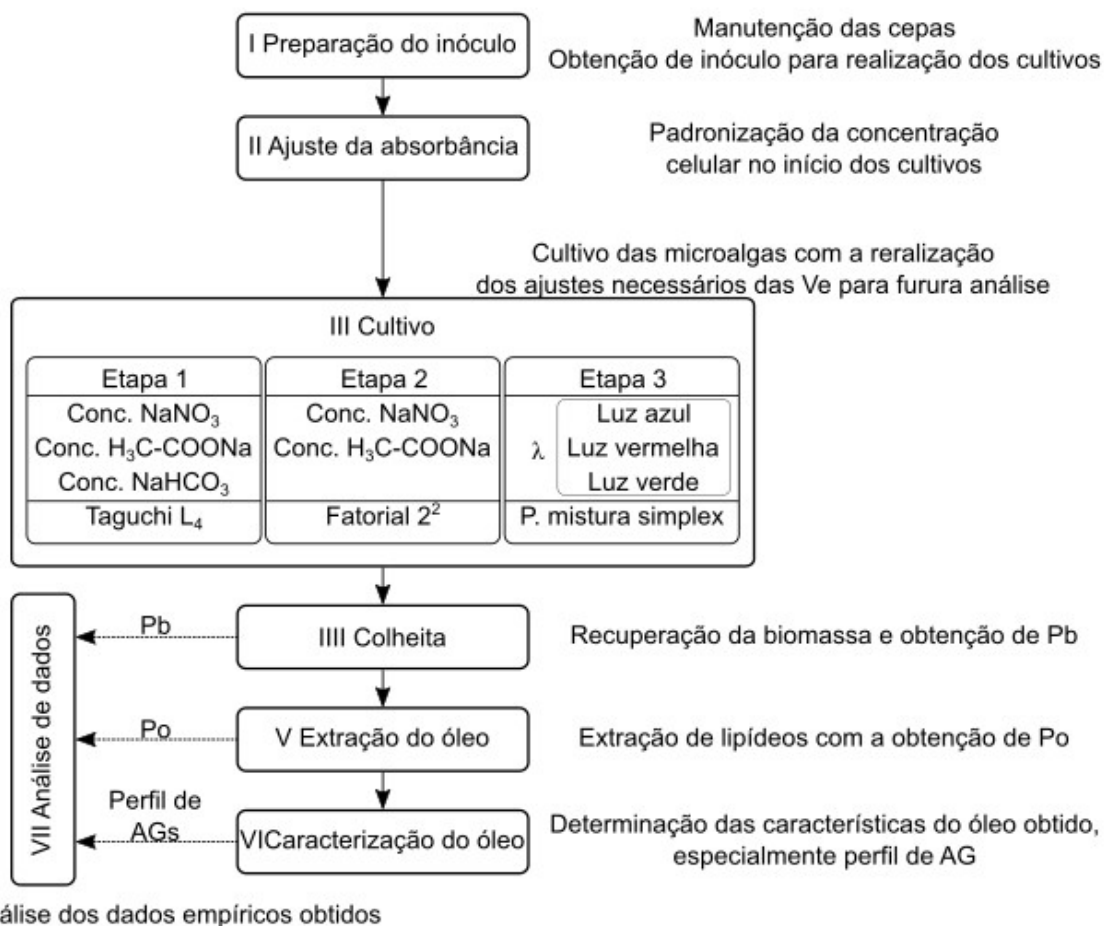
## 1.5 DELIMITAÇÃO DA PESQUISA

Dentro da grande variedade de microalgas presentes na natureza, o presente trabalho foi realizado com base nas espécies *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*. Esta escolha foi devido ao fato delas terem relativamente menos dados na literatura, especialmente a *N. gaditana* (vide item 1.2). Mas também pela existência de algumas características específicas que as tornam de interesse para a pesquisa e para a indústria. Isto significa que, embora os resultados possam ser comparados aos de outras espécies, os melhores ajustes reportados são restritos às duas espécies estudadas.

A Figura 2 foi elaborada para um melhor entendimento do método empregado no decorrer do presente trabalho.

Também existe grande quantidade de meios de cultivo e de fontes de nutrientes disponíveis na literatura. Foi escolhido como meio de cultivo base o Guillard f/2, com o nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) como fonte de nitrogênio e foram testadas duas fontes de carbono (acetato e bicarbonato de sódio). Os dados de melhor ajuste obtidos são restritos aos nutrientes estudados, embora seja possível a comparação dos resultados com o de outras fontes de carbono e nitrogênio reportados na literatura.

Figura 2: Diagrama do método utilizado no trabalho.



Fonte: Produção do próprio autor

O estudo dos comprimentos de onda ficou limitado à produtividade de biomassa, lipídeos e ao perfil de ácidos graxos da microalga *Dunaliella salina*. O uso da modelagem de mistura

possibilita, no entanto, a inferência de resultados para qualquer proporção de comprimentos de onda nas faixas do azul vermelho e verde.

## 1.6 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho se divide em 6 capítulos, com as seguintes funções:

1. **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA:** Contextualizar o trabalho, descrever seus objetivos e posicioná-lo frente à literatura pré-existente;
2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SISTEMÁTICA:** Apresentar a base teórica fundamental para a elucidação do presente trabalho;
3. **DESCRIÇÃO E MODELAGEM DO PROBLEMA:** Apresentar o método de pesquisa, os materiais utilizados e a análise estatística utilizada;
4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Descrever os resultados empíricos obtidos e as análises estatísticas efetuadas, bem como comparar e analisar estes frente à literatura existente;
5. **CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA FUTURAS PESQUISAS:** Apresentar as principais conclusões obtidas com base nos resultados empíricos, nas análises estatísticas efetuadas e na literatura existente. Oferecer sugestões oportunas para pesquisadores ingressantes e futuros trabalhos acadêmicos

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SISTEMÁTICA

### 2.1 MICROALGAS

De uma forma bem simples e genérica, as microalgas são organismos fotossintéticos eucariotos microscópicos. Elas podem ser encontradas em todo o mundo, tanto em água doce como salgada, mas também em alguns tipos de solo. As microalgas podem ser classificadas em 12 subdivisões (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; TOMASELLI, 2004).

O gênero *Nannochloropsis* (a qual a microalga *N. gaditana* pertence), faz parte da classe Eustigmatophyceae. Este gênero é composto por espécies de microalgas marinhas, unicelulares, não flageladas e com formato esférico levemente ovalado. Sua biomassa é considerada como fonte promissora de ácidos graxos poli-insaturados (TOMASELLI, 2004).

O gênero *Dunaliella* (do qual a *D. salina* faz parte), por sua vez, pertence à classe Chlorophyta. Esta classe é bastante abrangente, sendo que muitas das que a compõe possuem flagelo e produzem clorofilas a e b, além de carotenos como pigmentos (como é o caso da *D. salina*) (TOMASELLI, 2004).

#### 2.1.1 Microalgas estudadas

Das microalgas estudadas, a *D. salina* tem mostrado bons resultados de produtividade de biomassa, teor e produtividade de lipídeos, segundo a literatura consultada. Chen et al. (2015b), por exemplo, obtiveram máxima produtividade de 39 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de lipídeos em cultivos semicontínuos, utilizando como base o meio Guillard f/2.

Gao, Yang e Wang (2013), por sua vez, também utilizando meio Guillard f/2, obtiveram em torno de 25 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de produtividade de biomassa, com aproximadamente 6 mg L<sup>-1</sup> de produtividade de lipídeos, teor de óleo em média de 25% (dados extraídos de gráfico). Quando os mesmos autores cultivaram a microalga *D. salina* em uma segunda etapa com ausência de fonte de nitrogênio, curiosamente, a produtividade de biomassa caiu, mas não alterando a produtividade de lipídeos. Com isto, foi gerada uma biomassa com até 47,34% de lipídeos (GAO; YANG; WANG, 2013).

Hou et al. (2016), trabalhando com meio Guillard f/2 suplementado com 70 g L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, obtiveram produtividade de biomassa de 73 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. Estes dados não mostram apenas a boa produtividade da microalga *D. salina*, mas também comprovam sua tolerância a elevados níveis de íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bicarbonato).

Além de resistir a altos teores de bicarbonato, a microalga *D. salina* também é halotolerante, resistindo às grandes variações na salinidade (com a concentração de sal variando de 0,1 a 5,5 mol L<sup>-1</sup>) (CHEN *et al.*, 2015a).

Zheng *et al.* (2017), por sua vez, ao aumentarem subitamente a concentração salina no cultivo da microalga *D. salina* (de 30 para 60 ou 90 g L<sup>-1</sup>), verificaram estresse celular com a produção de glicerol e aumento na produção de ROS (Reactive Oxygen Species), elementos oxidantes que são produzidos normalmente no metabolismo celular, mas que são prejudiciais em grande quantidade.

Ainda segundo Zheng *et al.* (2017), é possível que as células da *D. salina* aumentem a produção do pigmento β-caroteno (com propriedades antioxidantes) para evitar ações danosas das ROS produzidas pelo estresse salino. Além da salinidade, o excesso de radiação luminosa pode gerar danos foto-oxidativos, estimulando a produção de β-caroteno (KHADIM *et al.*, 2018).

Voltando à questão da produtividade, Morowvat, Ghasemi (2016) utilizando um meio Johnson modificado, com 1,8 g L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>, 13 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 15 g L<sup>-1</sup> de glicose, obtiveram 460 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de produtividade de biomassa (180 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> com o meio Johnson tradicional).

Monte *et al.* (2018), embora não enfoque na produtividade de lipídeos em seu trabalho, estuda aprimoramentos para a ampliação de escala do processo de colheita da biomassa da *D. salina*, mostrando sua importância industrial.

O óleo da microalga *D. salina*, inclusive, é reportado na literatura como contendo altos teores de ácidos graxos poli-insaturados. Dentre eles se destacam o ácido linoleico (C18:2n6) e o γ-linolênico (C18:3n3) (CHEN *et al.*, 2015b; CHO *et al.*, 2015, 2016a, 2016b).

Além dos lipídeos, a microalga *D. salina* é mencionada na literatura devido à excelente produção de carotenoides, principalmente β-caroteno, especialmente em meio com alto índice de iluminação e escassez de nitrogênio (KEERTHI; DEVI; SARMA, 2015; MOROWVAT; GHASEMI, 2016; SAHA; MOANE; MURRAY, 2013). Este é um produto de grande interesse devido ao seu elevado valor agregado, que advém de suas aplicações como pigmento e na indústria farmacêutica.

Existem evidências da atuação do β-caroteno obtido da microalga *D. salina* para prevenir inflamações em casos de doenças infecciosas ocasionadas por vírus (LIN *et al.*, 2014). Também foi analisada sua eficácia na prevenção de danos hepáticos oriundos do CCl<sub>4</sub> (tetracloreto de carbono) em ratos (HSU *et al.*, 2008); evidências de possibilidade de tratamento de diabetes em

ratos (RUPEREZ *et al.*, 2009); além de estudos na área de tratamento de câncer, como, por exemplo, o de próstata (JAYAPPRIYAN *et al.*, 2013).

A microalga *N. gaditana*, por sua vez, também apresentou bons resultados de produtividade de biomassa e lipídeos. Curiosamente, os autores das publicações que concernem a esta espécie de microalga, ao contrário do observado com a *D. salina*, apresentaram com maior frequência seus valores de produtividade. Isto facilitou a análise de dados e revisão da literatura.

Mitra *et al.* (2015), por exemplo, utilizando meio *Conway* modificado (com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ ) e estudando fatores como salinidade, intensidade de luz e fotoperíodo, obtiveram máximos de produtividade de biomassa e lipídeos de  $45,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  e  $14,63 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , respectivamente.

Pedro *et al.* (2015), por sua vez, trabalharam em fotobiorreatores do tipo *raceway pond* sob iluminação solar, estudando diversos fatores: teor de nitrogênio, influência do clima (cultivos “*Outdoor*”) e a influência do modo de operação do fotobiorreator (batelada e contínuo). O meio de cultivo empregado pelos autores consistiu basicamente em água marinha enriquecida com fertilizantes contendo  $10,05 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  (equivalente a  $854 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ). Neste trabalho as máximas produtividades de biomassa e lipídeo foram de, respectivamente,  $190 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  e  $30,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . O mesmo grupo de pesquisa, trabalhando com o mesmo meio de cultivo ( $10,05 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$ ), em fotobiorreatores do tipo placa plana “*outdoor*” obtiveram produtividades de biomassa e de lipídeos de  $190 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  e  $38,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (PEDRO *et al.*, 2016).

Matos *et al.* (2015) trabalharam verificando a possibilidade do uso de um concentrado salino (com concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$ ), resíduo de uma planta de dessalinização, para uso em cultivo de microalgas. Para isso, o resíduo foi misturado, em diferentes proporções ao meio Guillard f/2, além de serem testadas diferentes fontes orgânicas de carbono (glicose, glicerol e glicerina). Neste estudo, com o uso de 75% do resíduo (25% de meio f/2) obteve-se  $16,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de produtividade de lipídeos.

Em trabalho posterior, utilizando o mesmo resíduo de planta de salinização, Matos *et al.* (2017) estudou parâmetros como a proporção do resíduo em mistura com meio Guillard f/2, uso de fontes orgânicas de carbono (glicose, glicerol e glicerina), fotoperíodo, além da possibilidade de cultivo nos regimes: autotrófico, mixotrófico e heterotrófico. Neste trabalho, a maior produtividade de biomassa,  $142 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , foi obtida em regime mixotrófico (com presença de fonte de carbono orgânica e iluminação); fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h escuro; meio de cultivo contendo 75% de resíduo (25% de meio Guillard f/2) e  $2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. A

maior produtividade de lipídeos ( $15,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), curiosamente, foi obtida em condição experimental semelhante àquela de maior biomassa, mas na ausência de uma fonte orgânica de carbono, cultivo autotrófico.

Além da boa produtividade de lipídeos, o óleo obtido a partir da microalga *N. gaditana* é reportado como contendo boas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido eicosapentaenoico (C20:5n3), linoleico (C18:2n6) e  $\gamma$ -linolênico (C18:3n3) (CARRERO *et al.*, 2015; JAZZAR *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2015, 2017; MITRA *et al.*, 2015; PEDRO *et al.*, 2015; PEÑA *et al.*, 2015). Também foi reportada a produção de oxilipinas, substâncias geradas pela oxidação de AGs, com propriedades anti-inflamatórias, por parte da microalga *N. gaditana* (ÁVILA-ROMÁN *et al.*, 2018).

Além disto, as microalgas estudadas são aplicadas em finalidades das mais diversas. Como, por exemplo, Fabra *et al.* (2017) que utilizaram de forma bem sucedida biomassa da microalga *N. gaditana* na elaboração de um filme híbrido com amido de milho. O emprego de células inteiras ou rompidas na produção dos filmes proporcionou melhorias de suas propriedades de isolamento. Segundo os autores, os filmes poderiam ter futura aplicação em embalagens biodegradáveis para produtos alimentícios.

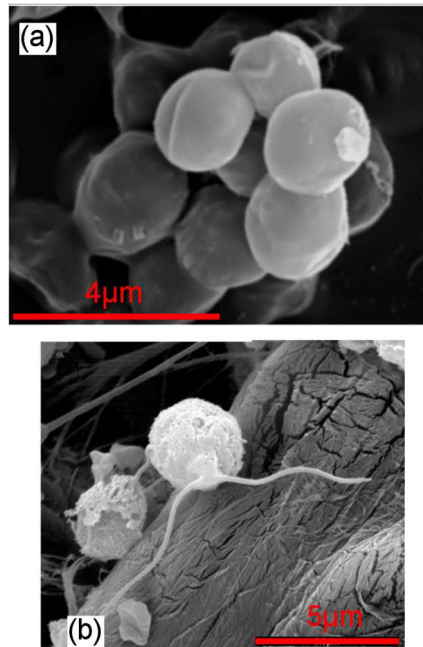
Uma aplicação mais tradicional e corriqueira das microalgas está na produção de alimentos para criação de peixes, camarão, dentre outros organismos marinhos e de água doce, além da larvicultura. Ferreira *et al.* (2018), por exemplo, estudaram a falta ou excesso de nutrientes no cultivo da microalga *N. gaditana*, que serviria de alimento para o microorganismo *Brachionus* sp. (que é utilizado como alimento em larvicultura). Em seu estudo, Ferreira *et al.* (2018) enfatiza a importância da qualidade da biomassa microalgal para uso na larvicultura, qualidade obtida ajustando de forma apropriada os parâmetros de cultivo da microalga.

Também há estudos que utilizam a biomassa microalgal para a criação de peixes. Como é o caso de Teuling *et al.* (2017), que utilizam biomassa de diversas microalgas, dentre elas *N. gaditana*, como alimento para Tilápia e peixe gato africano. Neste estudo foi avaliada a relação da resistência da parede celular da microalga com a capacidade de digerir e assimilar os nutrientes por parte dos peixes.

Em termos biológicos, as microalgas desempenham papel fundamental na cadeia alimentar, incluindo nos biomas marinhos (DEGENS *et al.*, 2018). Por isto, diversos trabalhos utilizam espécies de microalgas, como é o caso da *D. salina* e da *N. gaditana*, para o estudo de impacto de substâncias tóxicas sobre a vida marinha (BHUVANESHWARI *et al.*, 2018; SENDRA *et al.*, 2017).

Em caráter ilustrativo, a Figura 3 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura das microalgas: (a) *Nannochloropsis gaditana* e (b) *Dunaliella salina*.

Figura 3: Imagens de microscopia das microalgas (a) *N. gaditana*; (b) *D. salina*.



Fonte: Adaptado de (a) Jazzar *et al.* (2015) e (b) Hou *et al.* (2016).

### 2.1.2 Cultivo e colheita das microalgas

Uma vez definida a microalga a ser cultivada, ainda existem diversos fatores que influenciam o seu crescimento e desenvolvimento, tais como: configuração, tamanho e materiais empregados no fotobiorreator a ser utilizado; quais são e quanto de cada nutriente será adicionado ao meio de cultivo; qualidade e intensidade de iluminação; etc.

Ademais, após os cultivos, a biomassa precisa ser recuperada e armazenada, processo conhecido por colheita. Este procedimento pode ser feito de diversas formas, dentre as mais convencionais estão filtração e centrifugação. O processo de colheita pode também contar com uma etapa de floculação (prévia a centrifugação ou filtração) e, se esse for o caso, a escolha do floculante é de suma importância.

Neste item do trabalho buscou-se uma explanação geral, porém abrangente, sobre esses tópicos de interesse, que envolvem tanto a etapa de cultivo das microalgas, como também a colheita da biomassa.

Um primeiro tópico de interesse é o reator, mais conhecido por fotobiorreator, onde o cultivo das microalgas é realizado. O fotobiorreator, em si, pode ser das mais variadas formas



e tamanhos, mas com objetivos finais semelhantes: proporcionar boa iluminação para as microalgas (para a realização de fotossíntese); promover boa troca de gases (em geral com aeração, para a remoção do excesso de O<sub>2</sub> gerado na fotossíntese e fornecimento de CO<sub>2</sub>); possuir bom sistema de agitação (para evitar precipitação celular) (CARVALHO *et al.*, 2014).

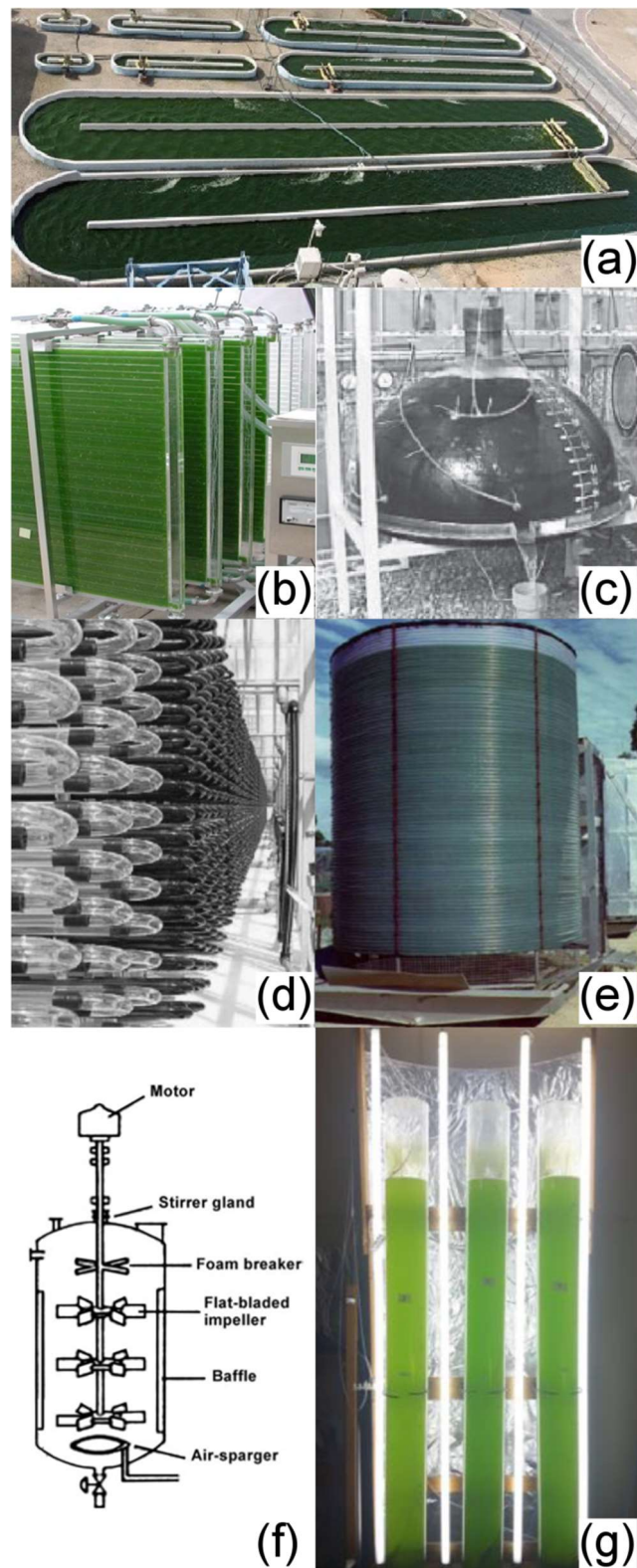
A classificação dos fotobiorreatores ocorre, basicamente de duas maneiras distintas: internos ou externos (dependendo se estão instalados em salas fechadas ou ao ar livre); abertos ou fechados (em virtude da possibilidade de contato direto entre o meio de cultivo e a atmosfera).

Com relação à primeira possível classificação dos fotobiorreatores, os cultivos feitos em ambientes externos (ou “*outdoor*”) tem a vantagem de reduzir custos com energia elétrica, uma vez que a iluminação é solar, não necessitando a instalação de lâmpadas ou refletores. Por outro lado, embora os cultivos internos (“*indoor*”) tenham o gasto energético com a iluminação, eles não sofrem as constantes variações climáticas, como dia e noite e as estações do ano. Portanto, parâmetros como fotoperíodo, temperatura e intensidade luminosa são mais facilmente controláveis nestes cultivos (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; CARVALHO *et al.*, 2014).

Quanto à classificação aberto/fechado, em geral, os fotobiorreatores ditos abertos (como é o caso da “*raceway pond*” ilustrada na Figura 4) apresentam custos de construção e operação menores, além de serem mais fáceis de operar. Contudo, a principal desvantagem destes sistemas de cultivo está justamente na principal característica que os distingue, o contato direto entre o meio de cultivo e a atmosfera. Este contato aumenta a probabilidade de contaminação do meio de cultivo com micro-organismos presentes na atmosfera, prejudicando a qualidade da biomassa final obtida. Além disto, aumenta a taxa de evaporação de água, que deve ser reposta. Esta característica é especialmente problemática para os cultivos “*outdoor*”. Neste caso, chuvas podem diluir o cultivo, que também está sujeito à queda de sujidades, como folhas, insetos e pó, por exemplo (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; CARVALHO *et al.*, 2014).

Os fotobiorreatores fechados, por sua vez, não apresentam este problema e são considerados mais produtivos em relação às “*raceway ponds*”, além de ocuparem uma menor extensão de área, porém com custos de produção e operação mais elevados. Por isto, fotobiorreatores fechados, em especial os “*indoor*”, são muitas vezes mais empregados quando se quer utilizar a biomassa para uma finalidade mais nobre (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; CARVALHO *et al.*, 2014; YUSUF, 2007).

Figura 4: Imagens ilustrando: (a) "raceway pond" e os fotobiorreatores: (b) placas planas; (c) domo; (d) tubular; (e) tubular helicoidal; (f) tipo tanque agitado e (g) coluna de bolhas.



Fonte: (a) e (b) Al Hattab; Ghaly e Pérez de Los Ríos (2015); (c) e (d) Posten (2009); (e) Yusuf (2007); (f) Carvalho *et al.* (2014) e (g) Loures *et al.* (2018).

Alguns exemplos de fotobiorreatores fechados apresentados na literatura podem ser citados: coluna de bolhas, tubular, placas planas tipo tanque agitado, dentre outros (vide Figura 4). Dentre estes fotobiorreatores, o de coluna de bolhas se destaca por sua versatilidade, fácil manuseio e operação. Esta classe de fotobiorreatores consiste em um recipiente cilíndrico, aerado pelo fundo, feito de material transparente, para a passagem da luz. O sistema de aeração, neste caso, cumpre a função de mistura, agitação e, principalmente, troca gasosa (com remoção de O<sub>2</sub> e injeção de CO<sub>2</sub>).

O fotobiorreator do tipo tanque agitado, por sua vez, tem semelhanças com o de coluna de bolhas, mas com razoáveis diferenças. No caso do fotobiorreator tanque, o cultivo também ocorre em um recipiente cilíndrico, tanque, areado pelo fundo. A principal diferença, contudo, fica a cargo do sistema de agitação mecânica, presente apenas no fotobiorreator do tipo tanque, que auxilia na homogeneização do meio de cultivo (CARVALHO *et al.*, 2014).

A composição do meio de cultivo também é de suma importância para o bom desenvolvimento das microalgas. Dentre os nutrientes adicionados, destaca-se a importância da fonte de nitrogênio, que pode ser na forma do sal nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>). Sabe-se de longa data na literatura, por exemplo, que o acúmulo, teor, de lipídeos no interior das células das microalgas pode ser ampliado em ambientes de cultivo com escassez de nitrato (RASDI; QIN, 2015; SAN PEDRO *et al.*, 2014; SUNG *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2014). Sung *et al.* (2017), por exemplo, trabalharam com a microalga *N. gaditana* em quatro fotobiorreatores de placa plana conectados em série. O regime de cultivo era contínuo, sendo no primeiro reator adicionado meio (375 mg L<sup>-1</sup> de nitrato). Enquanto isto, meio de cultivo era continuamente transferido de reator em reator até ser removido do sistema pelo último reator. Os autores observaram em seus experimentos a redução da concentração do nitrato ao longo dos reatores, pois este era consumido pelas microalgas, e, em paralelo, o aumento no teor de ácidos graxos (lipídeos).

Segundo Rasdi e Qin (2015), a relação de nitrato e fosfato (N:P) influencia a taxa de crescimento e a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Os autores verificaram que uma proporção de 120:1 de N:P aumenta o teor de determinados ácidos graxos poli-insaturados nas células da microalga *Nannochloropsis oculata*.

San Pedro *et al.* (2014), estudando a microalga da espécie *Nannochloropsis gaditana*, verificaram que a limitação na concentração de fosfato no meio não influencia de forma tão significativa na produção de biomassa e de lipídeos, quando comparada à limitação de nitrato.

Li *et al.* (2014), cultivando microalgas da espécie *Chlorella vulgaris*, verificaram que a concentração de nitrato pode inibir o crescimento celular das microalgas tanto quando em extrema falta como em grande excesso. Mantendo a concentração de fosfato fixa, 0,2 g L<sup>-1</sup>, os

autores verificaram que a melhor proporção N:P foi de 12, com concentração de nitrato de 1,5 g L<sup>-1</sup>.

Janssen *et al.* (2018), por sua vez, relatam que, apesar de a restrição de nitrogênio aumentar o teor de lipídeos, ela também dificulta a eficiência fotossintética, reduzindo a produtividade dos lipídeos. Uma solução proposta pelos autores foi o uso de um fotoperíodo de 16h claro 8h escuro, com a adição de quantidades predeterminadas de KNO<sub>3</sub> no início da fase escura. Segundo os autores, boa parte do nitrato era consumido na fase da noite e no início da fase clara. Os resultados apresentados pelos autores mostram bom crescimento celular e teor de lipídeos para a *N. gaditana* usando esta técnica.

Além da fonte de nitrogênio, também existe a necessidade da escolha da fonte de carbono, assim como a determinação da quantidade desta fonte a ser disponibilizada. Conforme a natureza da fonte de carbono empregada, o cultivo da microalga é classificado como: autotrófico, mixotrófico ou heterotrófico.

O cultivo heterotrófico ocorre quando apenas fontes inorgânicas de carbono (especialmente CO<sub>2</sub>) são empregadas, sob iluminação constante ou intermitente, de modo que a microalga obtenha energia através da luz e faça fotossíntese (GROBBELAAR, 2004). O bicarbonato também é uma fonte de carbono empregada em regimes autotróficos (JEON *et al.*, 2016).

No cultivo mixotrófico, por sua vez, ocorre à fotossíntese, pois é fornecido CO<sub>2</sub> e iluminação, porém também é fornecida uma fonte orgânica de carbono (glicose, acetato, melão e glicerina, por exemplo). Por fim, no cultivo heterotrófico é fornecida a fonte de carbono, porém não ocorre fotossíntese, pois o cultivo é realizado no escuro (GROBBELAAR, 2004).

A escolha da fonte de carbono, bem como o regime de cultivo da microalga é de extrema relevância, pois tem profundo impacto sobre o comportamento da microalga em questão. O uso de acetato de sódio como fonte orgânica de carbono no cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana*, por exemplo, têm forte influência sobre o metabolismo desta microalga (SHAH *et al.*, 2017). Quando se compara um cultivo autotrófico com um cultivo heterotrófico desta microalga, são evidenciadas 50 reações metabólicas específicas do cultivo autotrófico e 45 do cultivo heterotrófico. Em contrapartida, quando se compara um cultivo mixotrófico (em presença de luz e acetato) com um cultivo autotrófico, nota-se 24 reações específicas ao regime mixotrófico e 25 únicas ao regime autotrófico (SHAH *et al.*, 2017).

Li *et al.* (2014) estudaram o efeito do uso de glicose, como fonte orgânica de carbono, no acúmulo de lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris*. Segundo os autores, aumentar a proporção da concentração de glicose em relação ao nitrato (C:N) aumenta significativamente

a produção de lipídeos. Em outras palavras, o acúmulo de lipídeos foi maior em um ambiente que apresentou, ao mesmo tempo, deficiência na concentração de nitrato e abundância de glicose, fonte de carbono.

Cheirsilp e Torpee (2012), por sua vez, estudaram diversas microalgas, verificando benefícios no crescimento celular e na produção de lipídeos quando utilizadas ao mesmo tempo uma fonte de carbono orgânico (como a glicose, por exemplo), e uma fonte de carbono inorgânico (como é o caso do CO<sub>2</sub>), em um cultivo mixotrófico.

Abedini Najafabadi *et al.* (2015) avaliaram o efeito do uso de diversos tipos de fontes de carbono (orgânicas e inorgânicas) na produção celular, acúmulo de lipídeos e produção de ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*. Dentre as fontes de carbono testadas pelos autores, o uso de acetato de sódio, em um cultivo com baixa concentração de nitrato, foi o que apresentou o maior teor de lipídeos. Segundo os autores, o bicarbonato de sódio e o melão são fontes de carbono que propiciaram altos teores de ácido  $\alpha$ -linoleico (um dos ácidos graxos poli-insaturados do tipo  $\omega$ 3).

Hou *et al.* (2016) obtiveram bons resultados com a microalga *Dunaliella salina* usando bicarbonato como fonte de carbono. Os autores, inclusive, elucidam a vantagem do uso do bicarbonato em relação ao CO<sub>2</sub>, que apresenta baixa solubilidade no meio e por isto, em grande parte é perdido para a atmosfera. Isto faz com que o uso do NaHCO<sub>3</sub> torne-se mais conveniente em relação ao suprimento de CO<sub>2</sub> gasoso (HOU *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2017) também mencionam as mesmas vantagens do uso do NaHCO<sub>3</sub> em termos de crescimento celular e produção de carotenoides, em relação ao CO<sub>2</sub>.

Com isto, pode-se presumir grande influência da escolha da fonte de carbono sobre o crescimento celular, acúmulo de lipídeos e na produção de  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 das microalgas (ABEDINI NAJAFABADI *et al.*, 2015; CHEIRSILP; TORPEE, 2012; LI *et al.*, 2014).

Além dos fatores já apresentados, a iluminação dos fotobiorreatores também tem grande influência sobre a produtividade do cultivo. O uso de iluminação com lâmpadas LED é vantajoso devido ao seu baixo consumo energético e a possibilidade do uso de luz em diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ). Embora se possam questionar custos da implantação da iluminação LED, seu uso pode ser benéfico e vantajoso mesmo em cultivos “*indoor*” de plantas e árvores. Sabzalian *et al.* (2014), por exemplo, destaca vários fatores positivos do uso de iluminação azul e vermelha no cultivo de menta (com aumento de óleos essenciais) e melhor crescimento em algumas plantas, como a lentilha, o manjeriço e a flor maravilha.

Com relação às microalgas, diversos estudos utilizaram com sucesso LEDs como fonte de luz em fotobiorreatores (FULKE *et al.*, 2015; LUCKER *et al.*, 2014; OKUMURA *et al.*,

2015; YAN; ZHENG, 2014). Okumura *et al.* (2015) reportaram que o uso de LEDs é mais rentável em relação às lâmpadas fluorescentes quando se é utilizada elevada intensidade de luz. Além disto, os autores não observaram fotoinibição quando utilizada luz azul de alta intensidade luminosa.

Sabe-se, inclusive, que o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da luz utilizada no cultivo é um parâmetro essencial ao crescimento da microalga e o acúmulo de lipídeos, embora este efeito ainda não seja tão amplamente estudado com relação à produção de  $\omega 3$  e  $\omega 6$  (ABIUSI *et al.*, 2014; OKUMURA *et al.*, 2015; TEO *et al.*, 2014). Abiusi *et al.* (2014), por exemplo, verificaram influência de  $\lambda$  sobre o tamanho celular e a mobilidade da microalga *Tetraselmis suecica*. Segundo os autores, a luz vermelha produz células menores e mais móveis em relação à luz nos comprimentos azul, verde e branco. Os mesmos autores verificaram um ligeiro aumento no teor de ácido eicosapentaenoico (C20:5), um importante  $\omega 3$ , quando a microalga *Tetraselmis suecica* foi cultivada sob luz vermelha.

Teo *et al.* (2014), verificaram maior produção celular e lipídica nas microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. quando cultivadas sob luz azul em relação às luzes vermelha, verde e branca.

Yan e Zheng (2014) verificaram grande eficiência no uso combinado de iluminação nos comprimentos de onda vermelho e azul, bem como a importância da proporção da intensidade dos  $\lambda$ s, no cultivo da microalga *Chlorella* sp.

Hultberg *et al.* (2014) verificaram relevante importância de  $\lambda$  sobre a produtividade de biomassa e lipídeos da microalga *Chlorella vulgaris*. Em mesmo estudo foi evidenciado que a luz verde ocasionou redução no teor de lipídeos da microalga, contudo elevação no teor de ácidos graxos poli-insaturados.

Independente dos parâmetros escolhidos para a realização do cultivo (espécie de microalga, nutrientes, fonte de iluminação etc.), após encerrada esta etapa se faz necessário a recuperação, colheita, da biomassa. A colheita é o processo que visa à remoção da água de cultivo para a obtenção da biomassa em concentração alta o suficiente para que esta seja processada (extração de lipídeos, por exemplo). O processo de colheita pode ser efetuado de diversas formas, dentre elas pode-se citar:

- Colheita por ultrassom: Em suma, quando ultrassom é aplicado ao meio, para que se faça a colheita da biomassa, as células da microalga se aglomeram nos nodos do ultrassom, regiões de menor pressão, sendo colhidas mais facilmente (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; WAN *et al.*, 2015). Embora a colheita por ultrassom possa ser empregada

em modo contínuo, sendo uma vantagem, ela ainda tem custo elevado (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015).

- **Floculação química:** As células das microalgas apresentam naturalmente carga elétrica negativa, oriunda de terminais orgânicos desprotonados, tais como carboxilatos, fosfatos etc. Esta carga eletrostática auxilia na manutenção das células das microalgas em suspensão no meio de cultivo. O processo de floculação visa, basicamente, neutralizar esta carga elétrica, com a adição de um floculante, possibilitando que as células se arranjam em flocos e decantem. Este processo se dá com a doação de cátions metálicos por parte dos floculantes (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015). Pirwitz, Rihko-Struckmann e Sundmacher (2015), por exemplo, obtiveram excelentes resultados utilizando sulfato de alumínio,  $Al_2(SO_4)_3$ , e cloreto férrico,  $FeCl_3$ , como floculantes para a microalga *Dunaliella salina*. Ademais, o  $FeCl_3$  apresentou a vantagem de não prejudicar a água utilizada no cultivo, que pode ser reutilizada (PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015). Cancela *et al.* (2019), por sua vez, obtiveram ótimos rendimentos usando  $AlCl_3$  e  $CuSO_4$  como floculantes. Em geral, a floculação é uma técnica que é aplicada como um primeiro estágio da colheita, precedendo filtração ou centrifugação, por exemplo, com obtenção de elevados valores de eficiência (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; AXELSSON *et al.*, 2012; PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015).

- **Flotação:** Funciona com a geração de microbolhas que se prendem às células da microalga fazendo com que estas flutuem e sejam obtidas mais facilmente. Embora tenha a vantagem de não haver a adição de um produto químico, como é o caso da floculação química, o processo da geração das bolhas é custoso e não se tem evidências da viabilidade deste processo, especialmente para grandes escalas (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; BRENNAN; OWENDE, 2010).

- **Centrifugação:** Método físico que vêm se provando muito eficiente na colheita de microalgas no decorrer do tempo (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017). Sua principal desvantagem envolve elevados custos, especialmente para cultivos de grandes volumes, devido ao gasto energético (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; BRENNAN; OWENDE, 2010). Uma possível saída para este problema seria uma etapa prévia de floculação (PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015; WAN *et al.*, 2015).

- Filtração: Em geral, usa-se filtração a vácuo para se acelerar o processo de colheita. Uma desvantagem é que nem sempre a filtração convencional consegue reter as células da microalga, devido ao seu tamanho reduzido. Tendo-se que recorrer a processos como filtração por membrana e ultrafiltração (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; BRENNAN; OWENDE, 2010). Embora não seja uma etapa obrigatória, uma possível saída para este problema seria uma etapa prévia de floculação (WAN *et al.*, 2015). Monte *et al.* (2018), por sua vez, sem o uso de flocculantes, empregou filtração por membranas em escala piloto, como etapa de pré-concentração da biomassa da *D. salina* que era posteriormente centrifugada. Segundo os autores, a etapa de filtração auxilia na redução de custos energéticos e evita o rompimento da membrana celular durante a colheita.

### 2.1.3 Lipídeos, Ômega 3 e 6 ( $\omega 3$ e $\omega 6$ )

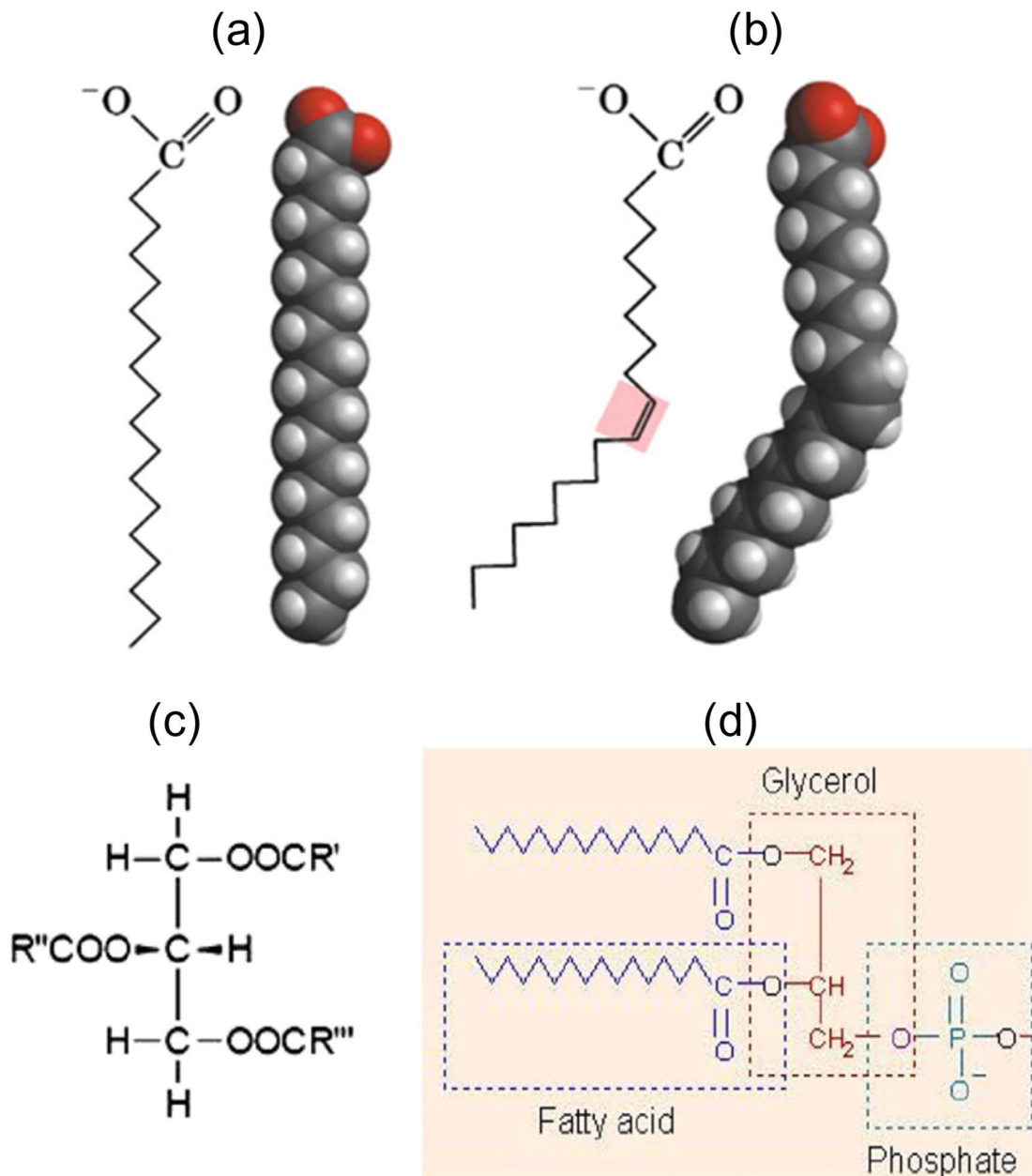
Ácidos graxos (AGs) são ácidos carboxílicos de cadeia longa, que podem ser formados apenas por ligações simples, sendo denominados saturados, ou podem conter uma ou mais duplas ligações, sendo denominados insaturados. A Figura 5 (a) representa o ácido graxo saturado esteárico de 18 carbonos, sem insaturações. Enquanto isto, a Figura 5 (b) ilustra o ácido insaturado oleico, também com 18 carbonos, mas com uma insaturação (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Quando os AGs estão conectados, por ligação éster covalente, a uma molécula de glicerol, existe um lipídeo apolar, que pode ser: monoglicerídeo (um AG ligado), diglicerídeo (dois AGs ligados) ou triglicerídeos (três AGs ligados). A Figura 5 (c) ilustra um triglicerídeo, com três AGs ligados ao glicerol por ligação do tipo éster (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Os AGs também podem estar desconectados de outra estrutura, sendo denominados AGs livres. Uma possível verificação da quantidade de AGs livres em um óleo é a sua acidez. Quando o AG está conectado a uma molécula de glicerol que tenha um grupo fosfato conectado a ela, conforme ilustra a Figura 5 (d), tem-se um fósfolipídeo (lipídeo polar). Também existem lipídeos polares quando AGs formam ligações do tipo éster com carboidratos (glicolipídeos). Os lipídeos apolares, em geral, têm função de acúmulo energético para a microalga, enquanto os polares cumprem um papel estrutural na parede celular. Além dos casos citados, existem lipídeos que não são compostos por AGs, como é o caso dos pigmentos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).



Figura 5: Esquemas ilustrativos: (a) ácido esteárico (C18:0); (b) ácido oleico (C18:1); (c) triglicerídeo; (d) fósfolípídeo.

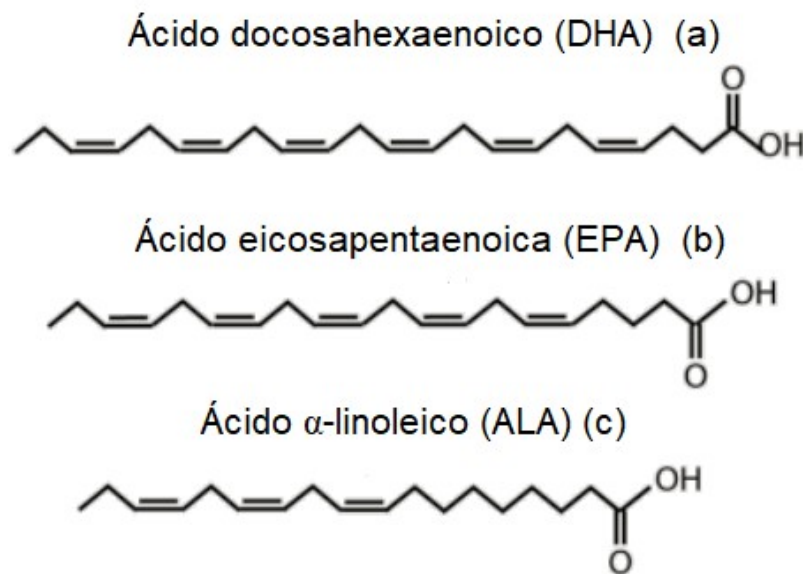


Fonte: Adaptado de Halim; Danquah; Webley, (2012).

Os AGs são classificados principalmente segundo o número de carbonos que compõe sua molécula e a quantidade de duplas ligações, insaturações, presentes na mesma. Uma possível representação para os ácidos graxos é: CX:Y, onde X é o número de carbonos e Y o número de insaturações. O ácido oleico, por exemplo, é composto por 18 carbonos e uma insaturação (monoinsaturado), vide Figura 5(b), sendo representado por C18:1. Enquanto isto, o ácido esteárico é representado por C18:0, vide Figura 5 (a) (MARKLEY, 1969).

Ácidos graxos com duas ou mais insaturações, denominados poli-insaturados (PUFAs), tem se destacado na indústria e pesquisa devido aos benefícios que trazem à saúde humana, caso inseridos em suficiente quantidade na dieta. Alguns destes AGs, que não são produzidos pelo organismo humano, têm recebido especial enfoque, tais como: o ácido eicosapentaenoico (*EPA*, C20:5), o ácido docosahexaenoico (*DHA*, C22:6) e ácido  $\alpha$ -linoleico (*ALA*, C18:3), ilustrados na Figura 6 (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014). Observando-se atentamente a Figura 6, nota-se que todos eles têm uma característica em comum, especialmente quando se se considera a instauração mais distante do terminal carboxílico. Para todos os AGs apresentados, esta instauração está no terceiro carbono a ser contado a partir do terminal metila, vide Figura 6, portanto todos são classificados como  $\omega$ 3 (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014; RYCKEBOSCH *et al.*, 2014; SIMON; BONE, 2013).

Figura 6: Estruturas moleculares dos ácidos graxos: (a) *DHA*; (b) *EPA* e (c) *ALA*.



Fonte: Adaptado de Martins *et al.* (2013).

Os  $\omega$ 3 apresentados têm sido relacionados a diversos benefícios a saúde humana, tais como: propriedades anti-inflamatórias (*EPA*, *DHA*), antitrombóticas (*EPA*), antiarrítmicas (*EPA*, *DHA*), vasodilatórias (*EPA*), além de serem relacionados com atividades preventivas e inibitivas de tumores (*DHA*), evitam estresse oxidativo (*DHA*), melhoram a densidade óssea (*DHA*), estão relacionados ao bom desenvolvimento cerebral (*ALA*) e diminuição da resistência à insulina (BELLOU *et al.*, 2014; GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014; MITRA *et al.*, 2015; SELVAKUMAR; UMADEVI, 2014).

O *ALA*, mais especificamente, tem grande relevância devido ao fato de ser precursor no corpo humano na geração do *EPA*, que precede a formação do *DHA* (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014). Outro componente precursor na produção do *EPA* e do *DHA* no corpo humano é o ácido graxo linoleico (C18:2). O ácido linoleico é um importante omega 6, que por não ser produzido no corpo humano, deve ser inserido na dieta (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014; WARD; SINGH, 2005).

Com relação às microalgas, de um modo geral, existem diversos estudos que apontam sua boa produtividade de  $\omega 3$  e  $\omega 6$ . Rykebosch *et al.* (2014), estudando microalgas das espécies *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis oculata* e *Pavlova lutheri*, verificaram que elas acumulam elevado teor de lipídeos em sua composição, cerca de 30% da massa seca das células. Além disso, esses mesmos autores relatam que a produção de  $\omega 3$  produzido por estas microalgas é promissora e pode, futuramente, substituir o uso do óleo de peixe.

Outros autores, como Ganesan; Brothersen e McMahon (2014), por exemplo, também veem como promissor o uso do óleo de microalgas como futura fonte de  $\omega 3$  e  $\omega 6$  no futuro. Martins *et al.* (2013) menciona vantagens do uso de  $\omega 3$  obtido a partir de microalgas em relação ao óleo de peixe, como elevada pureza e qualidade, além de melhores propriedades organolépticas.

O fato de ser obtido por fonte “vegetariana” também pode apresentar vantagens, como a não presença substancial de esteroides, como o colesterol (MARTINS *et al.*, 2013; RYCKEBOSCH *et al.*, 2014). Microalgas das espécies *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus* sp. e *Dunaliella salina* também se destacam como possíveis fontes de  $\omega 3$  (CUSTÓDIO *et al.*, 2014). Nalder; Miller e Packer (2015) também reportaram considerável concentração de  $\omega 3$  nas células de microalgas *Isochrysis* sp. Sharma e Schenk (2015) mencionaram boa produção de  $\omega 3$  da microalga *Nannochloropsis gaditana*.

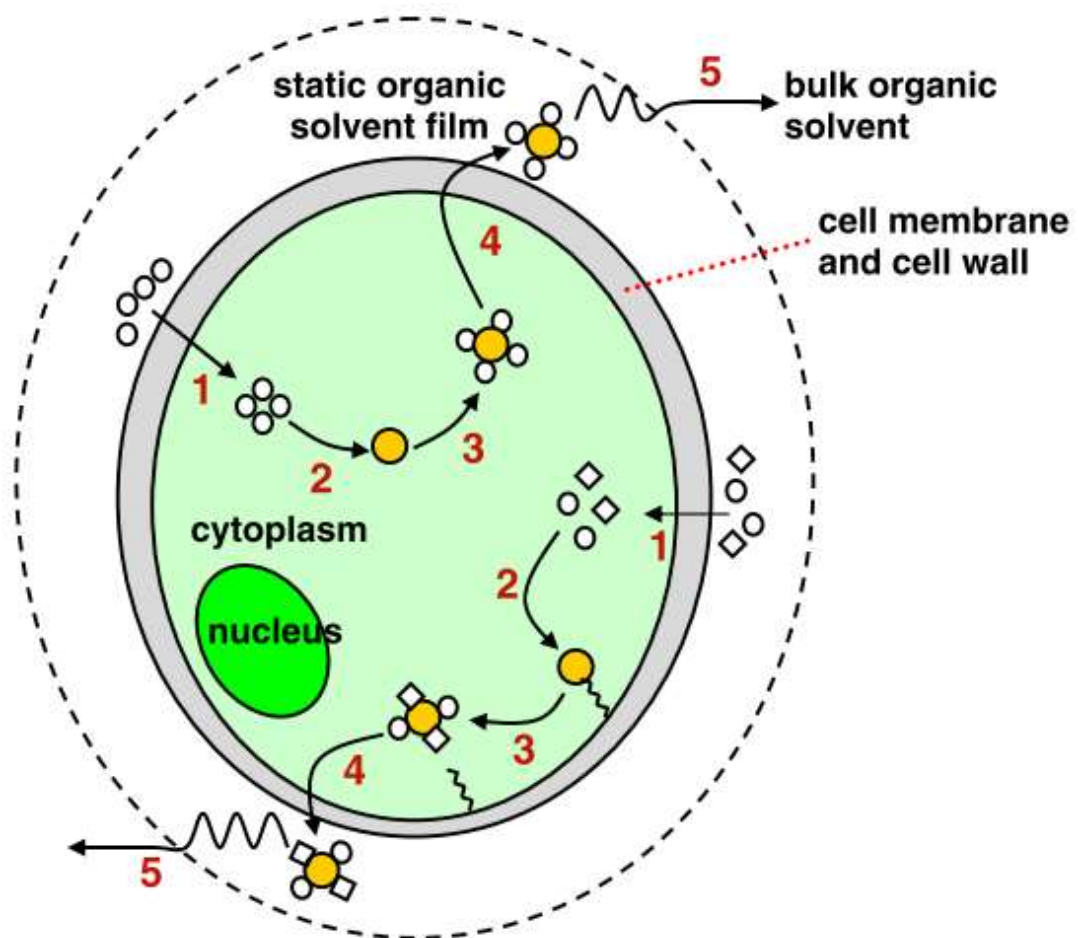
#### **2.1.4 Extração de lipídeos**

Uma vez obtida à biomassa, a partir da colheita do cultivo, a etapa seguinte é a extração dos lipídeos, inclusive para a obtenção dos  $\omega 3$  e  $\omega 6$ . Existem variadas formas de se obter o óleo microalgal e estes processos, de um modo geral, podem ser divididos em extrações físicas (ultrassom, micro-ondas etc.) ou químicas (extração por solvente). Embora exista esta classificação, muitas vezes, para se obter maiores rendimentos, é comum o uso combinado de processos físicos com químicos. Desta forma, os processos físicos atuam rompendo as células das microalgas, aumentando o contato dos lipídeos com o solvente, facilitando a extração e

melhorando seu rendimento (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

A técnica de extração por solvente, de forma simplificada, é realizada com a adição do solvente sobre a biomassa, para a remoção dos lipídeos por difusão através da membrana celular. A Figura 7 representa, esquematicamente, como a extração por solventes ocorre em nível celular.

Figura 7: Esquema ilustrativo de extração de lipídeos por solvente.



Fonte: Halim; Danquah e Webley, (2012).

Quando se adiciona um solvente apolar sobre a biomassa, em princípio, forma-se um filme estático de solvente ao redor da microalga. O solvente, então, penetra a membrana celular e interage com o lipídeo apolar que está aglomerado em “gotas” no citoplasma. Esta mistura de solvente e lipídeos, por difusão, sai da célula da microalga (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; KANNAN; PATTARKINE, 2014).

Ocorre, porém, que os lipídeos apolares podem estar formando complexos com lipídeos polares. Estes complexos estão fortemente ligados, por ligação de hidrogênio, à membrana celular. Apenas o uso de solventes apolares não é suficiente para romper estas ligações. Isto ocorre pois os solventes polares fazem apenas ligações do tipo Van Der Waals, mais fracas que as ligações de hidrogênio. Para se extrair estes lipídeos ligados à parede celular, melhorando o rendimento da extração, utiliza-se um solvente polar juntamente com o apolar (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

O solvente polar é útil nesta combinação pois se liga fortemente aos lipídeos polares do complexo de lipídeos, rompendo a ligação deste com a membrana celular. Este novo complexo que conta com os lipídeos apolares e polares, além de ambos os solventes empregados, sai da célula por difusão. Embora o uso da mistura de solventes polar com apolar auxilie no rendimento da extração, ele faz com que sejam arrastados também os lipídeos polares, além dos apolares (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Após um tempo prolongado de contato da biomassa com o(s) solvente(s), a biomassa é *separada*, por filtração ou centrifugação. À fase líquida é adicionada água ou uma mistura de água com o solvente apolar (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Isto faz com que haja uma separação de fases, com a obtenção dos lipídeos na fase orgânica, juntamente com o solvente orgânico. Nesta separação, várias impurezas são removidas juntamente com a água. É então evaporado o solvente da fase orgânica para a obtenção final do óleo (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Dentre os solventes possíveis para o uso nas extrações de lipídeo da microalga, a mistura clorofórmio (apolar) com metanol (polar) é a mais largamente empregada, com a vantagem de não necessitar da completa secagem da biomassa, processo energeticamente custoso) (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

A extração por solventes pode, para aumento de eficiência, ser realizada com o auxílio de processos físicos de extração, como é o caso das micro-ondas e do ultrassom (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

No caso das micro-ondas, mistura-se o solvente à biomassa e incidem-se as micro-ondas. As micro-ondas, ondas eletromagnéticas com frequência entre 0,3 e 300 GHz, atuam sobre a água da biomassa (além de outras moléculas polares) gerando aquecimento concentrado e abrupto. Este aquecimento sobre a biomassa provoca aumento de pressão interna às células levando à ruptura das mesmas, facilitando a extração dos lipídeos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

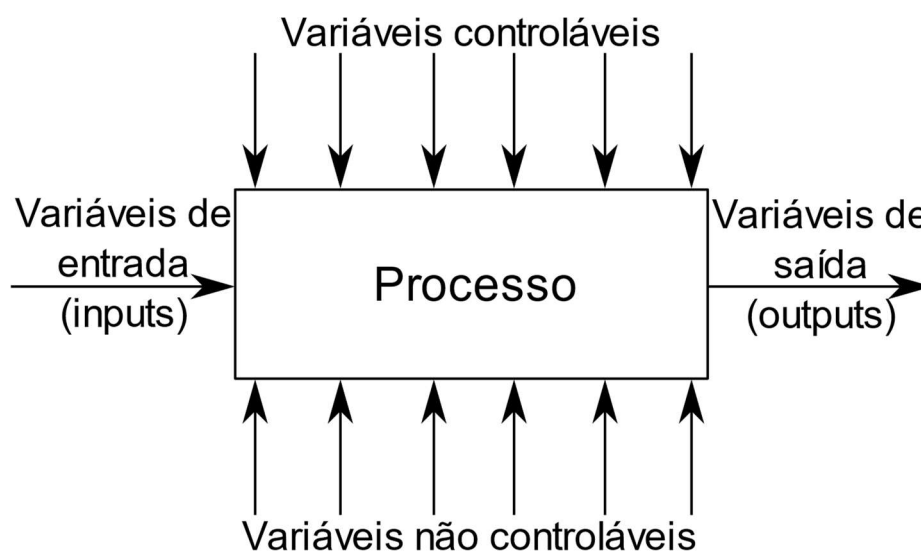
O método usando ultrassom, por outro lado, aplica ondas sonoras sobre a mistura solvente/biomassa, que gera ciclos de alta e baixa pressão ao longo de seu percurso. Os ciclos de baixa pressão geram bolhas por evaporação que são comprimidas e implodem no ciclo de alta pressão, num fenômeno denominado cavitação. A cavitação provoca o rompimento das células, facilitando a extração (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; KANNAN; PATTARKINE, 2014; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

Em ambos os métodos físicos mencionados, micro-ondas e ultra som, o rompimento celular libera os lipídeos que se encontravam no interior das células. Isto amplia seu contato com o solvente orgânico, melhorando o rendimento do processo (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

## 2.2 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS (DOE)

Os sistemas e processos de um modo geral, sejam estes em indústrias ou em centros de pesquisa, como é o caso dos cultivos de microalgas aqui reportados, podem ser sumarizados conforme ilustra a Figura 8. Nesta Figura são ilustradas as variáveis de entrada (inputs),  $V_e$ , e a variável de saída ou resposta (output),  $V_s$ , que pode ser uma, como está na figura, ou várias.

Figura 8: Esquema de bloco ilustrando um processo genérico.



Fonte: Montgomery (2013).

As  $V_s$  são as respostas observáveis do processo, às quais se tem interesse medir. Enquanto isto, as  $V_e$  são fatores que afetam o processo de modo a alterar sua resposta,  $V_s$ . Em outras

palavras, quando se ajusta uma ou mais  $V_e$  é provável que seja observada variação na resposta do processo, ou seja, que ocorra variação no valor das  $V_s$ .

As  $V_e$  podem ser distinguidas entre controláveis, que podem ser ajustadas da melhor forma o possível, e as não controláveis (ou de difícil controle), que não podem ser ajustadas e geram desvios inevitáveis nos valores das  $V_s$  (ruído).

Muito embora não seja possível a eliminação do ruído originado pelas  $V_e$  não controláveis, busca-se, em geral, estabelecer qual é a relação que existe entre as  $V_e$  controláveis e as  $V_s$ . Este processo deve ser conduzido com experimentos que manipulam as  $V_e$  e analisam seus efeitos sobre as  $V_s$ . Uma vez que se saiba a relação que existe entre elas, é possível se estabelecer um ajuste nas  $V_e$  que otimize as  $V_s$  (MONTGOMERY, 2013).

Uma possibilidade para o estudo da causalidade que existe entre as  $V_e$  e as  $V_s$  é executando uma série de experimentos que trabalha com uma  $V_e$  de cada vez, enquanto as demais estão fixadas em sua linha de base. Apesar de ser uma técnica muito empregada, variar um fator por vez pode levar a um número muito grande de experimentos. Além disto, com esta tática não se observa possíveis interações entre as  $V_e$ .

Diz-se que dois fatores têm interação quando um deles muda seu comportamento em função do modo em que o outro está ajustado (MONTGOMERY, 2013). Um exemplo interessante para ilustrar a interação de fatores seria o caso de uma pessoa doente, para a qual se deseja testar o efeito de três medicamentos distintos, A, B e C. Suponha que, a princípio, estes remédios foram testados isoladamente, gerando apenas uma pequena melhora na saúde do paciente. Agora suponha que, por ordem médica, ou por iniciativa própria, o paciente ingerisse os três medicamentos simultaneamente. Caso ele tenha melhora significativa em seu quadro, os medicamentos têm efeito positivo de interação. Por outro lado, se o paciente apresentar piora, ou morrer, diz-se que o efeito de interação dos medicamentos é negativo (TAGUCHI; CHOWDHURY; YUIN, 2005).

Para verificar interações e reduzir o número de experimentos a serem realizados, pode ser empregada a análise multivariada de fatores, quando todas as  $V_e$  são simultaneamente ajustadas nos experimentos (MONTGOMERY, 2013).

### **2.2.1 Fatorial completo $2^k$**

No planejamento fatorial completo  $2^k$  as variáveis de entrada,  $V_e$ , podem ser tanto quantitativas como qualitativas. A única restrição é que elas devem ser ajustadas em dois níveis de estudo para este tipo de planejamento, um nível alto (+) e um baixo (-). Exemplos de níveis

para variáveis quantitativas poderiam ser duas concentrações diferentes, dois pesos, dois comprimentos etc. Para variáveis qualitativas poderiam ser escolhidos dois catalizadores diferentes, a presença ou ausência de um elemento qualquer etc. (MONTGOMERY, 2013).

Com relação ao arranjo dos experimentos, o planejamento fatorial completo, como o nome sugere, trabalha com todas as combinações que existem entre os níveis + e - dos fatores estudados.

Organizando-se  $k$  fatores,  $V_e$ , em dois níveis cada, tem-se um total de  $2^k$  condições experimentais para se trabalhar. A Tabela 2 ilustra todas as combinações experimentais de um planejamento fatorial  $2^2$ . Nesta tabela, as  $V_e$  hipotéticas A e B são variadas entre os níveis – e + ao longo do total de  $2^2=4$  experimentos (MONTGOMERY, 2013).

Neste sentido, o experimento 3, por exemplo, é realizado com o fator A no nível baixo e o B no nível alto. Nestes casos os símbolos de + e – simbolizam, respectivamente +1 e -1, sendo conhecidos por variável código. As variáveis código costumemente substituem as variáveis originais (reais) do problema analisado, para facilitar a interpretação e análise dos dados (MONTGOMERY, 2013).

Tabela 2: Tabela com a combinação dos níveis alto (+) e baixo (-) de um arranjo fatorial  $2^2$ .

| Experimento | Fator |   |
|-------------|-------|---|
|             | A     | B |
| 1           | -     | - |
| 2           | +     | - |
| 3           | -     | + |
| 4           | +     | + |

Fonte: Adaptado de Montgomery (2013).

Uma vez realizados os experimentos referentes ao fatorial completo, com ao menos uma réplica em cada condição experimental ( $n>1$ ), deve-se fazer a análise dos dados obtidos com o uso da ANOVA (análise de variância). O número de réplicas para cada condição experimental,  $n$ , deve ser ao menos dois para ser possível a obtenção da soma dos quadrados dos erros.

A ANOVA trabalha, basicamente, estudando a variabilidade dos dados nas réplicas das condições experimentais e comparando-a com a variabilidade que é causada pelas  $V_e$  estudadas. Em outras palavras, utiliza-se a razão dos quadrados médios da  $V_e$  em estudo ( $QM_i$ ) pelo quadrado médio do erro ( $QM_E$ ), obtendo-se o valor de F.  $V_e$  mais influente provocam



maior variância sobre os resultados do processo em estudo, aumentando  $QM_i$  em relação à  $QM_E$ , o que torna  $F$  maior. Com base na distribuição de  $F$  de Snedecor, então é possível se verificar se os fatores estudados são relevantes ou se a sua influência sobre a  $V_s$  é desprezível, confundível com o erro (MONTGOMERY, 2013).

A determinação da ANOVA, como mencionado anteriormente, relaciona os quadrados médios dos fatores e interações em estudo ( $QM_i$ ) com os quadrados médios do erro ( $QM_E$ ). Para obter estes resultados é preciso, primeiramente calcular a soma dos quadrados ( $SQ_i$ ). De modo a facilitar a explicação, a Tabela 3 ilustra a realização de um planejamento  $2^2$  hipotético com duplicada em cada ponto.

Nesta tabela, os resultados obtidos estão representados por  $r_i$ , sendo que  $i$  vai de 1 a 8 (oito experimentos, considerando as réplicas). Além disto, os resultados estão organizados de modo que os dados da primeira linha ( $r_1, r_2, r_3$  e  $r_4$ ) foram obtidos com A no nível alto e os da segunda linha ( $r_5, r_6, r_7$  e  $r_8$ ) com A no nível baixo. Organização semelhante foi feita com o fator B nas colunas da tabela.

Tabela 3: Exemplo hipotético de um planejamento  $2^2$  para a determinação da ANOVA.

|                   |       | Ajuste do fator B                 |                                   | $y_i$                                |
|-------------------|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
|                   |       | +                                 | -                                 |                                      |
| Ajuste do fator A | +     | $r_1, r_2 (+,+)$<br>$R_1=r_1+r_2$ | $r_3, r_4 (+,-)$<br>$R_2=r_3+r_4$ | $y_{i1}=r_1+r_2+r_3+r_4$             |
|                   | -     | $r_5, r_6 (-,+)$<br>$R_3=r_5+r_6$ | $r_7, r_8 (-,-)$<br>$R_4=r_7+r_8$ | $y_{i2}=r_5+r_6+r_7+r_8$             |
|                   | $y_j$ | $y_{j1}=r_1+r_2+r_5+r_6$          | $y_{j2}=r_3+r_4+r_7+r_8$          | $y_{..}=y_{i1}+y_{i2}=y_{j1}+y_{j2}$ |

Fonte: Montgomery (2013).

Com base na Tabela 3, pode-se determinar as somas quadráticas totais,  $SQ_T$ , somas quadráticas dos fatores A e B,  $SQ_A$  e  $SQ_B$ , bem como a soma quadrática subtotal,  $SQ_S$ . Isto é feito com o uso das equações 1, 2, 3 e 4. Nelas:  $r_i$  são os dados experimentais,  $a$  e  $b$  são os números de níveis das variáveis A e B (neste caso  $a=b=2$ ; + e -);  $n$  é o número de réplicas em cada condição experimental (neste caso  $n=2$ );  $y_i$  e  $y_j$  são resultados das somas das linhas e colunas, respectivamente, das respostas obtidas,  $R_i$  é a soma das réplicas entre si, enquanto que  $y_{..}$  é a soma de todos os dados experimentais  $r_i$ , conforme ilustra a Tabela 3 (MONTGOMERY, 2013).

$$SQ_T = \sum_{i=1}^8 r_i^2 - \frac{y_{..}^2}{abn} \quad (1)$$

$$SQ_A = \frac{y_{i1}^2 + y_{i2}^2}{bn} - \frac{y_{..}^2}{abn} \quad (2)$$

$$SQ_B = \frac{y_{j1}^2 + y_{j2}^2}{an} - \frac{y_{..}^2}{abn} \quad (3)$$

$$SQ_S = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2}{n} - \frac{y_{..}^2}{abn} \quad (4)$$

Uma vez determinados os valores da SQ total ( $SQ_T$ ), subtotal ( $SQ_S$ ) e dos fatores A ( $SQ_A$ ) e B ( $SQ_B$ ), resta determinar a soma quadrática da interação,  $SQ_{AB}$ , e do erro,  $SQ_E$ , conforme equações 5 e 6 (MONTGOMERY, 2013).

$$SQ_{AB} = SQ_S - SQ_A - SQ_B \quad (5)$$

$$SQ_E = SQ_T - SQ_A - SQ_B - SQ_{AB} \quad (6)$$

Calculados os valores de SQ, é necessário se determinar os graus de liberdade,  $Gl_i$ , de cada caso para a obtenção dos quadrados médios ( $QM_i$ ). Os graus de liberdade representam, de forma simplificada, o número de elementos independentes de cada SQ. A Tabela 4 demonstra o cálculo de cada  $Gl_i$ .

Tabela 4: Determinação da ANOVA para planejamento fatorial completo  $2^k$ .

| Fonte de variação | SQ        | Gl                         | QM                            | F                         |
|-------------------|-----------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| A                 | $SQ_A$    | $Gl_A = a - 1$             | $QM_A = SQ_A / Gl_A$          | $F_A = QM_A / QM_E$       |
| B                 | $SQ_B$    | $Gl_B = b - 1$             | $QM_B = SQ_B / Gl_B$          | $F_B = QM_B / QM_E$       |
| Interação         | $SQ_{AB}$ | $Gl_{AB} = (a - 1)(b - 1)$ | $QM_{AB} = SQ_{AB} / Gl_{AB}$ | $F_{AB} = QM_{AB} / QM_E$ |
| Erro              | $SQ_E$    | $Gl_E = ab(n - 1)$         | $QM_E = SQ_E / Gl_E$          |                           |
| <b>Total</b>      | $SQ_T$    | $Gl_T = abn - 1$           |                               |                           |

Fonte: Montgomery (2013).

Dividindo-se a soma quadrática,  $SQ_i$ , pelo seu respectivo grau de liberdade,  $Gl_i$ , obtém-se o quadrado médio ( $QM_i$ ). Por fim, para obter o valor de F, divide-se cada quadrado médio das Ve e interações em estudo ( $QM_i$ ) pelo quadrado médio do erro ( $QM_E$ ), conforme ilustra a Tabela 4 (MONTGOMERY, 2013).

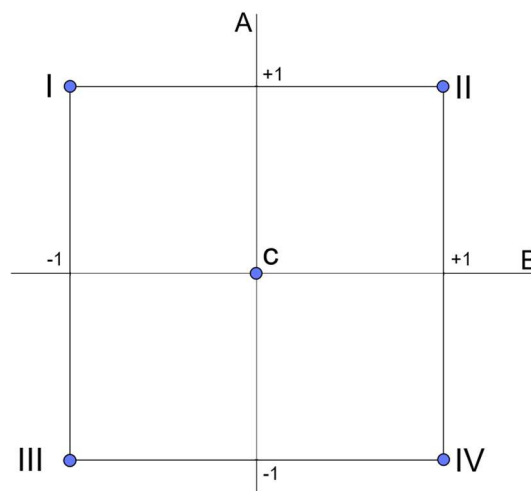
Com relação à modelagem, quando um planejamento fatorial completo como o  $2^2$  é aplicado, obtém-se um modelo como o apresentado na equação 7. Onde a, b, c e d são os coeficientes, A e B são as Ve, y é a Vs e  $\epsilon$  é o erro do modelo.

Este modelo resulta em uma superfície planar. Contudo, com possíveis distorções, devido à presença do fator A\*B, interação. Estas distorções, por outro lado, nem sempre são o suficiente para modelar o caso em que está sendo estudado. Para averiguar se a região estudada precisa de um modelo de segunda ordem, com fatores quadráticos, bem como gerar um melhor estudo estatístico, uma possível solução é a adição de pontos centrais (MONTGOMERY, 2013).

$$y = aA + bB + cAB + d + \epsilon \quad (7)$$

O ponto central no planejamento  $2^2$  pode ser representado esquematicamente pela Figura 9. Por esta figura, percebe-se que o ponto central encontra-se equidistante dos níveis alto (+) e baixo (-) de ambas as variáveis estudadas, A e B. Em casos quando não se fazem réplicas nos experimentos do fatorial  $2^2$ , o uso de réplicas no ponto central pode servir de base para a estimativa do erro experimental (MONTGOMERY, 2013).

Figura 9: Experimentos do planejamento fatorial completo  $2^2$ (I-IV) com ponto central (C).



### 2.2.2 Matrizes ortogonais Taguchi

Além do planejamento fatorial completo  $2^k$ , o método desenvolvido pelo Engenheiro e Estatístico Genichi Taguchi, é também uma excelente opção para a análise de processos com múltiplas variáveis de entrada. Com este método, é possível se verificar, com um número reduzido de experimentos, quais variáveis de entrada realmente possuem forte influência sobre as variáveis de saída.

De certa forma, as matrizes ortogonais de Taguchi são baseadas nos planejamentos fatoriais completos, contudo sem a realização de todas as combinações que existem entre os níveis dos fatores. A notação para as matrizes ortogonais Taguchi é  $L_i$ , sendo que  $i$  é o número de experimentos necessários para a realização da análise estatística. A matriz  $L_8$ , por exemplo, representada na Tabela 5, é baseada no planejamento fatorial completo  $2^7$ .

Com o planejamento apresentado na Tabela 5, é possível à análise de um processo com até 8 fatores (Ve) que podem ser arranjados de A até G. É perceptível pela Tabela 5 que as matrizes Taguchi usam valores 1 e 2 para os níveis dos fatores, podendo usar mais números (1, 2, 3, 4), dependendo da quantidade de níveis que se quer estudar no fator.

Nota-se, inclusive, que os níveis, 1 e 2, estão organizados de modo que: em todas as colunas aparecem quatro vezes o nível 1 e quatro vezes o 2; para qualquer par de colunas todas as possíveis combinações entre 1 e 2 ((1,1); (1,2); (2,1); (2,2)) aparecem duas vezes cada. Estas observações fazem com que a matriz de experimentos seja balanceada, ou ortogonal (TAGUCHI, 1986; TAGUCHI; CHOWDHURY; YUIN, 2005).

Tabela 5: Arranjo ortogonal Taguchi  $L_8$ .

|   | A (1) | B (2) | C (3) | D (4) | E (5) | F (6) | G (7) |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| 2 | 1     | 1     | 1     | 2     | 2     | 2     | 2     |
| 3 | 1     | 2     | 2     | 1     | 1     | 2     | 2     |
| 4 | 1     | 2     | 2     | 2     | 2     | 1     | 1     |
| 5 | 2     | 1     | 2     | 1     | 2     | 1     | 2     |
| 6 | 2     | 1     | 2     | 2     | 1     | 2     | 1     |
| 7 | 2     | 2     | 1     | 1     | 2     | 2     | 1     |
| 8 | 2     | 2     | 1     | 2     | 1     | 1     | 2     |

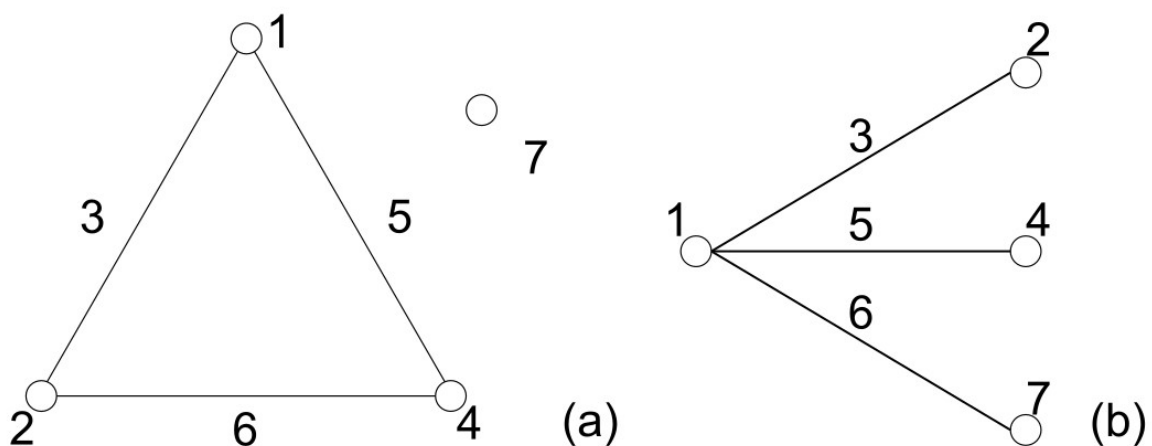
Fonte: Taguchi (1986).

Também, pela Tabela 5, percebe-se que não são realizadas todas as combinações dos níveis dos oito fatores, pois isto levaria a  $2^7=128$  experimentos. Isto gera imensa redução no número de experimentos, proporcionando economia de tempo e recursos, contudo há limitações no emprego da técnica.

A principal limitação do uso das matrizes ortogonais reside sobre a determinação do efeito das interações dos fatores. A matriz ortogonal  $L_8$ , por exemplo, é passível do cálculo de algumas interações, mas não todas as possíveis interações entre os fatores. Contudo, para tal, não é possível a análise simultânea de 7 Ve.

A Figura 10 ilustra esquematicamente o modo como interações podem ser determinadas em uma matriz ortogonal Taguchi  $L_8$ . Nesta figura são apresentados dois possíveis arranjos para esta finalidade. Em ambos os casos, entretanto, é possível a determinação de apenas três interações. Observando o caso (1), se a terceira, quinta e sexta colunas não estiverem ocupadas por fatores (Ve). Ou seja, se trabalharmos com 4 Ve apenas, será possível a determinação das interações entre os fatores que estão nas: primeira e segunda; segunda e quarta e primeira e quarta colunas. Em outras palavras, seguindo aquilo que está escrito na Tabela 5, poder-se-ia determinar as interações: AB, AD e BD, apenas. Sendo que as colunas C, E e F estariam vazias (sem fatores), pois estas colunas serão usadas para a determinação do efeito das interações. O segundo arranjo, (2), tem igual lógica de funcionamento, sendo que a escolha de um ou de outro cabe ao pesquisador.

Figura 10: Gráficos lineares mostrando duas possibilidades de interações,(a) e (b), de um planejamento  $L_8$ .



Fonte: Taguchi (1986).

Existem, porém algumas matrizes Taguchi, tais como as  $L_{12}$ ,  $L_{18}$  e  $L_{36}$ , cujos efeitos das interações são distribuídos e confundidos com os efeitos principais das  $V_e$ . Isto faz com que, para estes arranjos, não seja possível a determinação do efeito das interações. O fato de os arranjos Ortogonais não determinarem as interações entre os fatores, ao contrário daquilo que ocorre com o fatorial completo, até certo ponto coloca este método em paralelo com o estudo de uma variável por vez (mencionado anteriormente). Segundo seu criador, Genichi Taguchi, em seu livro (TAGUCHI; CHOWDHURY; YUIN, 2005), o emprego de seu método é bem sucedido especialmente para processos cujos fatores têm baixa interação. Ainda segundo esta fonte, a aplicação das matrizes se dá com a checagem da reprodutibilidade dos dados com a execução de experimentos comprobatórios. Caso o experimento comprobatório não atinja os valores preditos, é dito que o experimento falhou e que o ponto de ótimo não foi encontrado (TAGUCHI; CHOWDHURY; YUIN, 2005).

Por outro lado, a principal vantagem do método de Taguchi ainda está na avaliação simultânea de vários fatores com poucos experimentos. Ademais, também foi mencionada boa relação dos estudos usando Taguchi em escala de laboratório com sua aplicabilidade, em escala industrial (TAGUCHI; CHOWDHURY; YUIN, 2005).

Um sistema de medida muito empregado nos arranjos ortogonais Taguchi é a razão sinal ruído (S/N). Este é um método que vem sendo há muito tempo empregado em estações de rádio para avaliar a relação que existe entre o sinal produzido, pela voz do locutor, por exemplo, e o ruído de fundo, para verificar a qualidade da transmissão. A adoção do S/N pelo método Taguchi segue, basicamente, os mesmos princípios. S/N, portanto, pode ser definido pela equação 8. Em outras palavras, S/N é a relação que existe entre a força do sinal produzido por um fator e o ruído do processo, ou a razão do quadrado da sensibilidade pelo quadrado da variabilidade (TAGUCHI *et al.*, 2005).

$$S/N = \frac{\text{potência do sinal}}{\text{potência do ruído}} = \frac{\text{sensibilidade}^2}{\text{variabilidade}^2} \quad (8)$$

Existem várias vantagens no emprego da razão S/N na análise de dados. Dentre elas, está o fato desta razão englobar em apenas uma função todos os ruídos que influenciam o processo. Contudo, a principal vantagem é que, ao aumentar S/N, o pesquisador aumentará a robustez do seu processo ao invés de apenas buscar o valor alvo da variável de saída ( $V_s$ ). Ou seja, ao se encontrar a combinação das  $V_e$  com maior S/N, encontra-se a combinação que, dentre as

estudadas, é a menos influenciável pelo erro (mais robusta). Obtém-se, desta forma, um processo mais estável e confiável (TAGUCHI *et al.*, 2005).

O modo de determinação do valor de S/N varia segundo o que se deseja obter da Vs estudada. Caso o objetivo seja aumentar a Vs, utiliza-se a equação 9. Caso o objetivo seja minimizar a Vs a Equação é a 10. A Equação 11, por sua vez, é empregada quando se deseja atingir um valor nominal para a Vs. Estas equações são aplicadas para cada condição experimental do arranjo ortogonal Taguchi. Desta forma, o planejamento L<sub>8</sub>, ilustrado na Tabela 5, gerará 8 valores de S/N (TAGUCHI *et al.*, 2005).

Nas Equações 9-11: n é o número de réplicas para cada condição experimental,  $y_i$  são os resultados empíricos obtidos em uma mesma condição experimental. Devido à complexidade da Equação de S/N para um valor nominal, foram adotados os valores de  $S_m$  e  $V_e$  na Equação 11. Estes valores são calculados pelas Equações 12 e 13, respectivamente (TAGUCHI, 1986; TAGUCHI *et al.*, 2005).

$$S/N = -10 \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (9)$$

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

$$S/N = 10 \log \frac{\left(\frac{1}{n}\right)(S_m - V_e)}{V_e} \quad (11)$$

$$S_m = \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n} \quad (12)$$

$$V_e = \frac{1}{n-1} \left( \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n} \right) \quad (13)$$

Uma vez realizados os experimentos, ao menos em duplicata, a análise dos dados se dá com o uso da análise de variância (ANOVA).

### 2.2.3 Planejamento de mistura

Neste estudo estatístico, é avaliada a influência que a composição de uma mistura de dois ou mais elementos tem sobre uma ou mais Vs. O planejamento de mistura, ao contrário do que ocorre com os planejamentos anteriormente mencionados, apresenta dependência entre as Ve, uma vez que elas tratam de uma composição. De um modo geral, esta dependência pode ser representada pela Equação 14. Nela, o somatório de  $X_i$  (teor de cada um dos  $n$  componentes da mistura) deve resultar na totalidade da composição 1 (100%) (MONTGOMERY, 2013).

$$\sum_{i=1}^n X_i = 1 \quad (14)$$

O planejamento de mistura simplex com centroide, empregado na terceira etapa deste trabalho, está ilustrado na Figura 11. Nesta figura, estão representados os pontos experimentais realizados com relação à uma mistura de três componentes (luz azul, luz verde e luz vermelha).

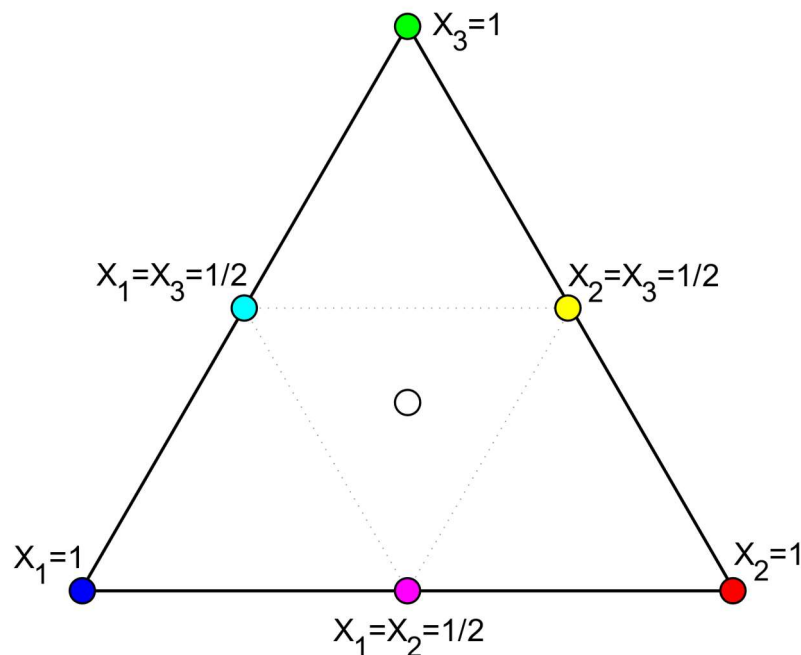
As representações dos componentes puros são mostradas a seguir: Luz azul (1, 0, 0),  $X_1=1$ ; Luz vermelha (0, 1, 0),  $X_2=1$ ; Luz verde (0, 0, 1),  $X_3=1$ . Além das componentes puras, o planejamento utilizado também prevê misturas de componentes dois a dois, em que cada componente compõe metade da mistura, conforme segue: azul e vermelho ( $\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0$ ),  $X_1=X_2=\frac{1}{2}$ ; azul e verde ( $\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}$ ),  $X_1=X_3=\frac{1}{2}$ ; verde e vermelho ( $0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}$ ),  $X_2=X_3=\frac{1}{2}$ . Por fim, o ponto central do planejamento é uma mistura em que os três componentes participam em igual concentração  $X_1=X_2=X_3=\frac{1}{3}$  ( $\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}$ )(MONTGOMERY, 2013).

O planejamento de mistura possibilita o uso de diversos polinômios para a modelagem, como o linear, o quadrático, o cúbico especial e o cúbico completo. Dentre estes, o polinômio cúbico especial, mostrado na Equação 15, apresentou ótimos ajustes para os dados experimentais obtidos no presente trabalho. Na Equação 15, Y representa a Vs,  $X_i$  as Ve Teor de cada componente na mistura) e  $\beta_i$  as constantes do modelo.

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_1 X_3 + \beta_6 X_2 X_3 + \beta_7 X_1 X_2 X_3 \quad (15)$$



Figura 11: Planejamento de mistura simplex com centroide.



Fonte: Montgomery (2013).

### 2.3 FUNÇÃO DESIRABILITY

O método *desirability* é uma possível maneira de se buscar ótimos locais em problemas que envolvem múltiplas respostas, sendo especialmente utilizado na indústria.

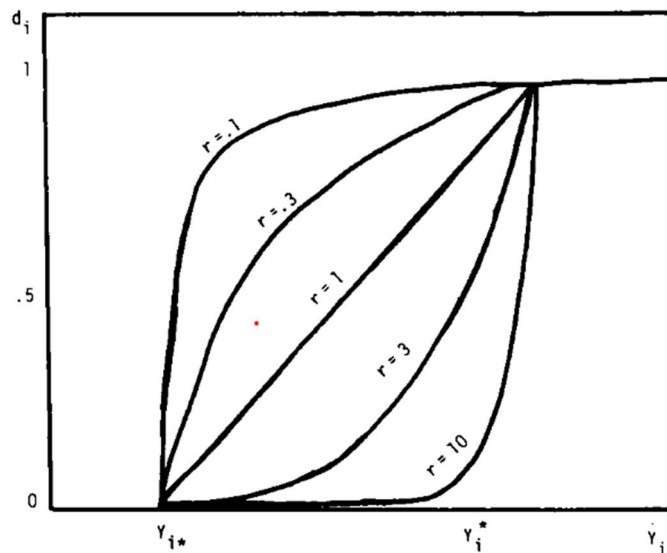
Primeiramente o problema precisa ser estatisticamente analisado, cada variável de resposta  $Y_i$  deve ser modelada. Então, cada  $\hat{Y}_i$  (valor estimado de  $Y_i$ ) é transformado em uma função *desirability*  $d_i$ , de tal modo que  $0 \leq d_i \leq 1$ . Sendo o objetivo de obter  $d_i$  o mais próximo o possível de 1, mesmo que a função original  $\hat{Y}_i$  não seja de maximização. Ademais, valores de resposta que geram  $d_i = 0$  são considerados inaceitáveis, são respostas que inviabilizam o processo (DERRINGER; SUICH, 1980).

As transformações de  $\hat{Y}_i$  para  $d_i$  dependem do objetivo da Vs original. Se o objetivo era a maximização da Vs, a transformação é feita pela Equação 16. Nesta equação:  $\hat{Y}_i$  são os valores estimados da Vs;  $Y_{i*}$  é o menor valor aceitável para a Vs (o processo fica inviável para  $\hat{Y}_i \leq Y_{i*}$ , algo representado por  $d_i = 0$  na função *desirability*);  $Y_i^*$  é o maior valor para  $\hat{Y}_i$  (valores de resposta acima de  $Y_i^*$  são aceitáveis, porém não agregam considerável valor ao processo) (DERRINGER; SUICH, 1980).

$$d_i = \begin{cases} 0 & \hat{Y}_i < Y_{i*} \\ \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_{i*}}{Y_i^* - Y_{i*}} \right]^r & Y_{i*} \leq \hat{Y}_i \leq Y_i^* \\ 1 & \hat{Y}_i > Y_i^* \end{cases} \quad (16)$$

Por fim, o valor de  $r$  é um fator determinado pelo usuário e representa a maneira que a  $V_s$  deve ser otimizada. A Figura 12 mostra o comportamento da função *desirability* para diversos valores de  $r$  (DERRINGER; SUICH, 1980). Para efeitos de entendimento, vamos supor um exemplo hipotético em que a  $V_s$   $Y$  tem as características:  $Y_{i*} = 3$  e  $Y_i^* = 5$ . Neste exemplo hipotético, para valores de resposta inferiores a 3 o processo se torna inviável, portanto, valores abaixo de 3 são inaceitáveis ( $d_i = 0$ ). O ideal seria obter respostas o mais próximo de 5 ( $d_i = 1$ ). Valores de resposta acima de 5 são aceitáveis, porém não agregam muito ao processo. Por isto, para  $\hat{Y}_i \geq Y_i^*$  a função *desirability* é constante e igual a 1.

Figura 12: Relação entre valores de  $r$  e o comportamento da função Desirability para uma  $V_s$  a ser maximizada



Fonte: Derringer; Suich (1980).

Neste exemplo, se o usuário escolhe um valor alto de  $r$ , 10,0 por exemplo, a função *desirability* ascende lentamente para 1. No exemplo dado, um valor alto de  $r$  significaria que valores baixos da  $V_s$ , próximos de  $Y_{i*} = 3$ , são indesejáveis (baixos valores de *desirability*).

Neste caso, valores altos de *desirability* (desejáveis) somente serão atingidos quando a Vs estiver próximo à  $Y_i^* = 5$ .

Quando se escolhe um valor baixo de r, 0,1 por exemplo, a função *desirability* ascende rapidamente. Neste caso, mesmo valores relativamente baixos da Vs (próximos à  $Y_{i^*} = 3$ ) têm alta *desirability*. Valores baixos de r são usados quando não é necessário grandes aumentos na Vs, sendo a principal preocupação manter  $\hat{Y}_i > Y_{i^*}$  (resposta acima do menor valor aceitável).

De certa forma r representa o rigor da otimização. Para altos valores de r, apenas altos valores da Vs gerarão alta *desirability*. Caso usado quando se tem elevado rigor na resposta. Para baixos valores de r, há pouco rigor na otimização, qualquer valor acima de  $Y_{i^*}$  se torna interessante para  $r=0,1$ . De forma intermediária, quando  $r=1$  a função *desirability* se torna linear em função de  $\hat{Y}_i$  (DERRINGER; SUICH, 1980).

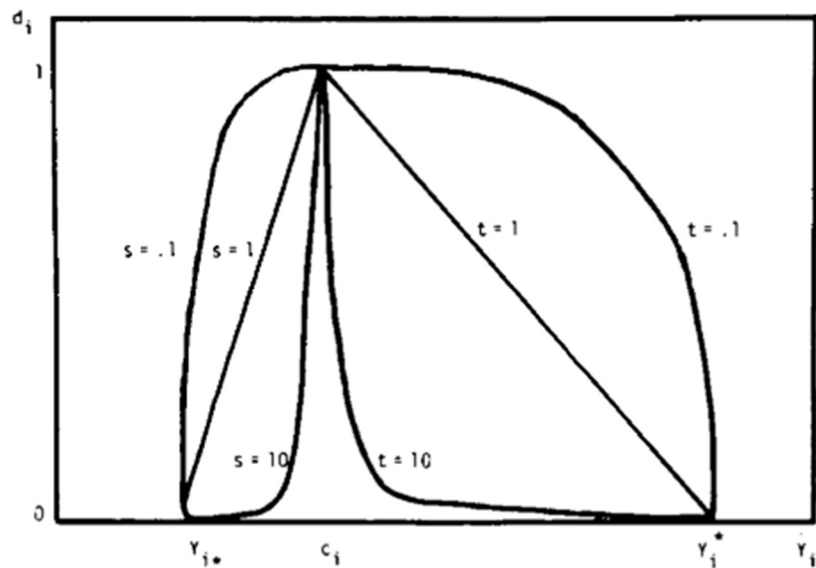
Da mesma forma que se pode desejar maximizar a Vs, existe também a possibilidade de o objetivo da Vs ser um mínimo, para o caso em que a função *desirability* segue a Equação 17, similar à Equação 16 (DERRINGER; SUICH, 1980).

$$d_i = \begin{cases} 1 & \hat{Y}_i < Y_{i^*} \\ \left[ \frac{Y_i^* - \hat{Y}_i}{Y_i^* - Y_{i^*}} \right]^r & Y_{i^*} \leq \hat{Y}_i \leq Y_i^* \\ 0 & \hat{Y}_i > Y_i^* \end{cases} \quad (17)$$

Caso o objetivo do estudo seja obter um valor nominal,  $c_i$ , da Vs y, utiliza-se a Equação 18. Sendo:  $c_i$  o valor alvo para a Vs; s e t constantes determinadas pelo usuário, com propriedades semelhantes ao r das Equações 16 e 17, conforme ilustra Figura 13 (DERRINGER; SUICH, 1980).

$$d_i = \begin{cases} \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_{i^*}}{c_i - Y_{i^*}} \right]^s & Y_{i^*} \leq \hat{Y}_i \leq c_i \\ \left[ \frac{\hat{Y}_i - Y_i^*}{c_i - Y_i^*} \right]^t & c_i \leq \hat{Y}_i \leq Y_i^* \\ 0 & \hat{Y}_i < Y_{i^*} \text{ ou } \hat{Y}_i > Y_i^* \end{cases} \quad (18)$$

Figura 13: Relação entre valores de  $s$  e  $t$  e o comportamento da função Desirability para uma  $V_s$  que deve ser ajustada em um valor nominal



Fonte: Derringer; Suich (1980).

Uma vez todas as  $V_s$  estimadas,  $\hat{Y}_i$ , terem sido transformadas em funções *desirability*,  $d_i$ , resta combinar estas funções em uma única. Isto é feito usando a uma média geométrica, para obter  $D$ , conforme Equação 19. Neste caso,  $k$  variáveis *desirability*, obtidas de  $k$   $V_s$ , foram aglutinadas na função  $D$ . Sendo que  $D$  equilibra as propriedades das funções *desirability* originais e, também está contido no intervalo  $[0,1]$  (DERRINGER; SUICH, 1980).

$$D = (d_1 * d_2 * d_3 * \dots * d_k)^{1/k} \quad (19)$$

É importante ressaltar que  $D$  é sensível aos valores inaceitáveis, ou proibitivos de todas as  $V_s$  estudadas. Independentemente do número de  $V_s$  estudadas,  $k$ , se uma delas estar em uma região proibitiva para o processo ( $d_i = 0$ ), o valor final de  $D$  também será nulo. Isto ocorre mesmo que todas as demais  $V_s$  estejam em valores aceitáveis, conforme pode-se notar pela Equação 19. Algo bastante interessante para a averiguação de ajustes inapropriados (DERRINGER; SUICH, 1980).

A principal desvantagem da função *desirability*, por outro lado, está no fato de não levar em conta possíveis interações entre as  $V_s$ . Além disto, ignora-se as variâncias individuais das  $V_s$  e também covariâncias entre elas. Isto pode levar à erros de análise e desvios do ótimo global, com a obtenção apenas de ótimos locais.

### 3 DESCRIÇÃO E MODELAGEM DO PROBLEMA

#### 3.1 LINHAGENS DE MICROALGAS

As estirpes das microalgas *Nannochloropsis gaditana* (BMAK 130) e *Dunaliella salina* (BMAK 116) foram gentilmente doadas pelo Departamento de Oceanografia do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP – SP).

#### 3.2 MEIOS DE CULTIVO E PROCESSOS DE DESINFECÇÃO DOS FOTOBIOREACTORES

O meio utilizado para o cultivo das microalgas foi o Guillard f/2 modificado (GUILLARD, 1975; LIU, 2016), composto pelos componentes [ $\text{mg L}^{-1}$ ]: sal marinho  $36,0 \times 10^3$ ;  $\text{NaNO}_3$  75,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,0;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $9,8 \times 10^{-3}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $22,2 \times 10^{-3}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $10,0 \times 10^{-3}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $180,0 \times 10^{-3}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $6,3 \times 10^{-3}$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3,15;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  4,36, tiamina (B1)  $100 \times 10^{-3}$ ; cianocobalamina (B12)  $0,5 \times 10^{-3}$ ; biotina (B7)  $0,5 \times 10^{-3}$ .

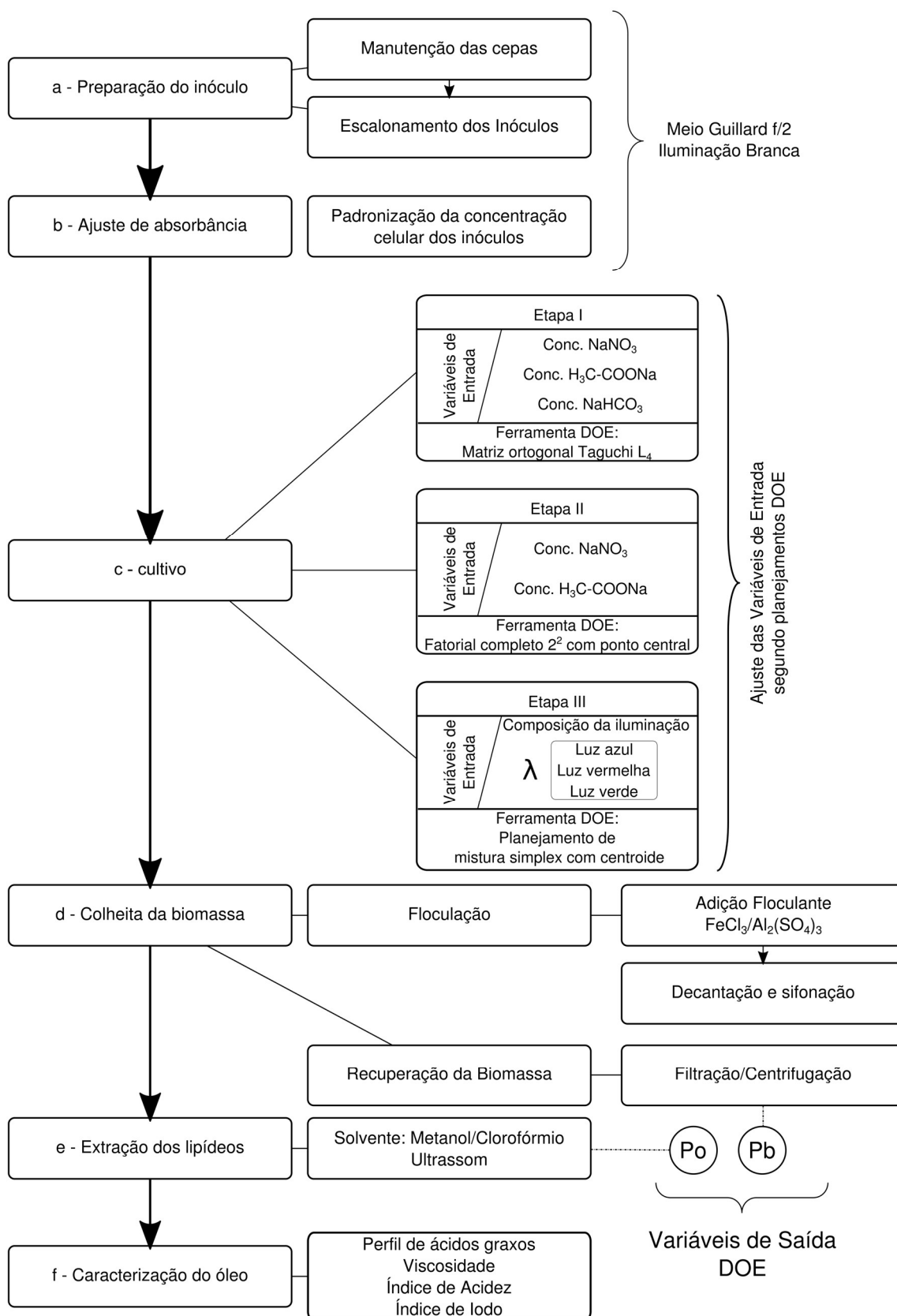
Este foi o meio utilizado nos inóculos, contudo, a concentração do nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) variou nos experimentos, visto que foi uma  $V_e$  estudada pelo trabalho. Também foram adicionados em determinados experimentos acetato de sódio e/ou bicarbonato de sódio como fonte de carbono.

A desinfecção dos meios de cultivo se procedeu de duas formas possíveis: por autoclave ( $1 \text{ kgf cm}^{-2}$  por 30 min), para os cultivos de pequena escala (cepário, manutenção e inóculos); ou com uso de hipoclorito de sódio, para cultivos de escala maior (fotobiorreator coluna de bolhas de 10 L), segundo procedimentos já estabelecidos pelo grupo de pesquisa e descritos por Lourenço (2006).

#### 3.3 ETAPAS DOS CULTIVOS DAS MICROALGAS

Ao longo da execução dos experimentos que abrangem o escopo desse trabalho, um ciclo básico de etapas, que compreende desde a preparação do inóculo até a obtenção e análise do óleo microbiano, se repete para todos os cultivos. A Figura 14 ilustra todas as etapas envolvidas durante o cultivo das microalgas, que foram repetidas para todos os experimentos:

Figura 14: Etapas básicas dos procedimentos experimentais.



Fonte: Produção do próprio autor

- (a) *Preparação do inóculo*: Serve para manter um estoque mínimo de células de microalgas vivas tanto para manutenção (manutenção das cepas das microalgas) quanto para aumento de escala dos inóculos, para execução dos experimentos propriamente ditos;
- (b) *Ajuste da absorvância*: Este ajuste teve como finalidade manter a mesma concentração inicial de células nos cultivos, visto que a variação na concentração celular inicial influencia no crescimento da microalga ao longo do cultivo. Desta forma, os reatores foram inoculados com as quantidades apropriadas de inóculo.
- (c) *Cultivo das microalgas*: Nesta etapa do trabalho foi empregado o planejamento de experimentos (DOE) para a análise estatística dos resultados. Os experimentos deste trabalho, bem como a análise estatística, evoluem em uma sequência ordenada de três etapas. Estas fases são descritas a seguir e também estão sumarizadas na Figura 14 :
- Etapa I: Com o uso de uma matriz ortogonal Taguchi L<sub>4</sub> foram avaliadas as influências de duas fontes de carbono (acetato de sódio e bicarbonato de sódio), bem como a concentração de nitrato de sódio sobre a produtividade das microalgas. A escolha do acetato e do bicarbonato foi baseada em relatos na literatura que indicam que a utilização destes nutrientes pode aumentar a produção de lipídeos, bem como favorecer a produção de determinados ácidos graxos poli-insaturados essenciais ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) (ABEDINI NAJAFABADI *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2013).
  - Etapa II: Utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com ponto central, foi avaliada a concentração do nitrato e do acetato, fonte de carbono com melhores resultados na etapa anterior.
  - Etapa III: Com o emprego de um planejamento de mistura simplex com centroide, foi avaliado o efeito do comprimento de onda ( $\lambda$ ) da iluminação sobre a produtividade da microalga *D. salina*. Foram feitos dois planejamentos de mistura levando em consideração o  $\lambda$  como Ve. Em um dos planejamentos considerou-se as concentrações de nitrato e acetato com os melhores resultados da etapa anterior. Um segundo planejamento, similar ao primeiro, foi executado sem adição de acetato ao cultivo. Estes planejamentos visaram a comparação do comportamento da produtividade da microalga variando-se  $\lambda$  na presença e na ausência de uma fonte de carbono orgânica (acetato).
- (d) *Colheita da biomassa*: A etapa da colheita da biomassa se dá em duas partes:

- Floculação: Etapa inicial da colheita da biomassa após o término do cultivo. Consiste na adição de um agente floculante para que as células das microalgas se agrupem em flocos e decantem. A água sobrenadante resultante deste processo é removida por sifonação. Este processo reduz o volume de trabalho, facilitando as etapas posteriores;
  - Recuperação da biomassa: Filtração ou centrifugação do material obtido na etapa anterior. Etapa final do processo de colheita.
- (e) *Extração dos lipídeos*: Etapa que teve como objetivo a obtenção do óleo microalgal. Para essa finalidade foi empregado um método modificado de Folch; Lees; Stanley, (1956), usando uma mistura metanol e clorofórmio, como solução extratora, e ultrassom para provocar a ruptura celular;
- (f) *Caracterização do óleo microalgal*: Obtenção de características do óleo obtido, tais como viscosidade, índice de acidez, índice de iodo e perfil de ácidos graxos.

### 3.4 PREPARO DOS INÓCULOS E AJUSTE DE ABSORBÂNCIA

As cepas das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina* foram mantidas em erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo Guillard f/2 (com 75 mg de NaNO<sub>3</sub>). Estes cultivos foram mantidos no interior de uma incubadora, continuamente iluminada por uma lâmpada LED de 15 W. Para a manutenção do banco de células, foram realizados repiques das células a cada 15 dias.

Em seguida, foram feitas ampliações de escala, escalonamentos, para cultivos com volume útil de trabalho de 3 L em erlenmeyers com capacidade de 5 L, também iluminados constantemente por lâmpadas LED e aerados por compressores diafragmáticos com uma vazão de 1,5 L min<sup>-1</sup>. Antes do início de cada experimento, os inóculos foram avaliados com relação às suas absorvâncias, sendo seus valores ajustados para o início dos cultivos.

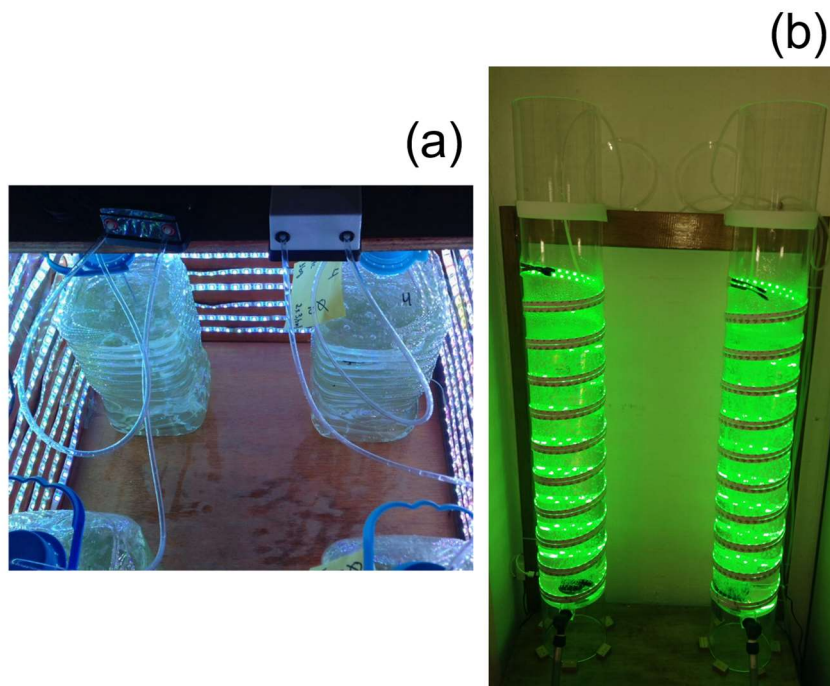
Nas duas primeiras etapas, os reatores foram incubados com 10% de inóculo. Para a terceira etapa em que foram empregados os reatores de coluna de bolhas, com maior volume de trabalho (10 L), foi empregado 25% de inóculo. A maior quantidade de inóculo dos reatores de colunas de bolhas faz com que os experimentos comecem com concentrações celulares maiores, evitando riscos de contaminação ao cultivo. Esta ação preventiva está especialmente vinculada com o maior volume de trabalho dos fotobiorreatores e ao uso da água clorada (em substituição ao meio esterilizado por autoclave).



### 3.5 CULTIVOS

No presente trabalho, os cultivos foram feitos em fotobiorreatores do tipo tanque (usados nas Etapas I e II) e coluna de bolhas (usado na Etapa III). Considerando-se que o custo da construção do fotobiorreator tem forte impacto no valor do produto final (CARVALHO *et al.*, 2014), foram utilizados materiais de baixo custo, como tanques reutilizados de politereftalato de etileno (PET), para os reatores tipo tanque, tubos de acrílico e suportes de madeira para os reatores coluna de bolhas (vide Figura 15). O sistema de agitação empregado foi composto por compressores de ar diafragmático para ambos os casos.

Figura 15: Fotobiorreatores utilizados: (a) nas Etapas I e II e (b) III do cultivo



Fonte: Produção do próprio autor

#### 3.5.1 Etapa I: Estudo da influência da fonte de carbono na produtividade celular e lipídica de microalgas

Um arranjo ortogonal Taguchi  $L_4$  foi empregado para avaliar a influência das variáveis de entrada,  $V_e$  (concentração de nitrato, acetato e bicarbonato de sódio), no cultivo das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*. Com este planejamento, foi possível a análise simultânea da influência desses três fatores sobre as produtividades de biomassa e de lipídeo (ambos em  $[\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}]$ ), variáveis de saída ( $V_s$ ). Embora a análise utilizada não

forneça informações sobre as interações entre as Ve, ela propicia suficiente informação estatística para o presente estudo, necessitando um número reduzido de experimentos.

A Tabela 6 sumariza as Ve, sendo todas elas referentes à composição do meio de cultivo. O parâmetro 1 se refere à concentração de nitrato de sódio do meio. Quando este parâmetro está no nível baixo (1), a concentração de nitrato é baseada no trabalho de Rasdi; Qin (2015), enquanto que em nível alto (2) a concentração de nitrato de sódio é igual àquela prevista para o meio de cultivo Guillard f/2. Os parâmetros 2 e 3 consistem na utilização ou não de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e acetato de sódio ( $\text{H}_3\text{C-COONa}$ ), respectivamente, como fonte extra de carbono, além do  $\text{CO}_2$  atmosférico injetado pela aeração do meio. A escolha de  $2\text{g L}^{-1}$  se baseou em alguns trabalhos que obtiveram sucesso em cultivos mixotrófico usando  $2\text{g L}^{-1}$  de glicose (CHEIRSILP; TORPEE, 2012; MATOS *et al.*, 2017).

Tabela 6: Fatores estudados de acordo com a matriz Taguchi  $L_4$

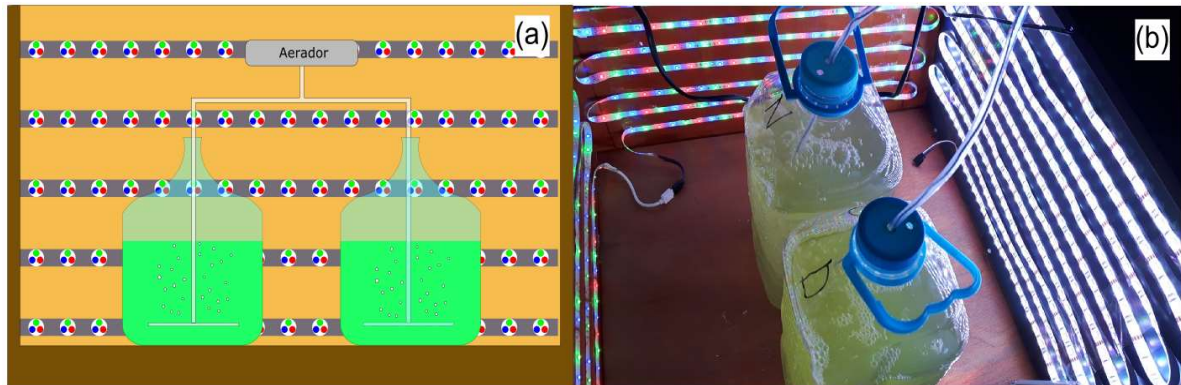
| Nº | Parâmetro  | Nível |    |
|----|--|-------|----|
|    |  | 1     | 2  |
| 1  | Concentração de nitrato [ $\text{mg L}^{-1}$ ]             | 25    | 75 |
| 2  | Concentração de bicarbonato de sódio [ $\text{g L}^{-1}$ ] | 0     | 2  |
| 3  | Concentração de acetato de sódio [ $\text{g L}^{-1}$ ]     | 0     | 2  |

Fonte: Produção do próprio autor

Nessa etapa do estudo, a iluminação se manteve constante durante todo o cultivo, empregando-se lâmpadas de LED brancas (150 klux) para esta finalidade. A aeração foi mantida com vazão de  $1,5\text{ L min}^{-1}$ . A Figura 16 ilustra os fotobiorreatores, em operação, empregados nesta etapa.

Após o término dos cultivos, foi verificada a produtividade celular, em termos de massa seca ( $\text{Pb} - [\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}]$ ) e a produtividade de lipídeos ( $\text{Po} - [\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}] [\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}] [\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}]$ ). Com base nestes resultados, foi realizada a análise estatística, visando selecionar a fonte de carbono mais adequada para o cultivo e a melhor concentração de nitrato. Todos os experimentos dessa primeira etapa, representados na Tabela 7, foram realizados em duplicata.

Figura 16: Fotobiorreatores usados na 1ª etapa: (a) esquema ilustrativo; (b) fotografia.



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 7: Condições experimentais do planejamento ortogonal Taguchi L<sub>4</sub>

| Experimento | Concentração de acetato<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Concentração de bicarbonato<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Concentração de Nitrato<br>[mg L <sup>-1</sup> ] |
|-------------|---|---|--|
| 1           | 0 (1)   | 0 (1)   | 25 (1)   |
| 2           | 0 (1)   | 2 (2)   | 75 (2)   |
| 3           | 2 (2)   | 0 (1)   | 75 (2)   |
| 4           | 2 (2)   | 2 (2)   | 25 (1)   |

Fonte: Taguchi (1986)

### 3.5.2 Etapa II: Estudo da concentração de acetato e nitrato de sódio no cultivo das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*

Esta etapa teve como objetivo ajustar os parâmetros mais influentes da etapa anterior (descrita no item 3.5.1), a concentração de nitrato de sódio e a concentração de acetato de sódio, visando aumentar ainda mais a produtividade das microalgas.

Para essa finalidade foi empregado um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com ponto central para cada microalga estudada (*Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*). Ao contrário das matrizes ortogonais Taguchi, o estudo fatorial completo permite a análise da interação entre os fatores abordados, o que permitiu uma análise mais aprofundada entre a fonte de nitrogênio (NaNO<sub>3</sub>) e a fonte de carbono escolhida na etapa anterior (CH<sub>3</sub>-COONa). Os dados de partida para este estudo foram aqueles de melhor resultado obtidos na primeira etapa (item 3.5.1).

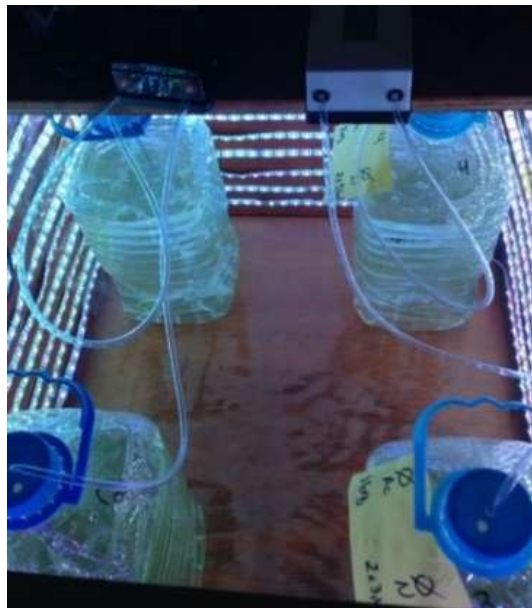
A Tabela 8 sumariza os níveis escolhidos para as  $V_e$  estudadas, enquanto que a Tabela 9 indica as condições experimentais das 7 corridas realizadas. Os experimentos da Tabela 9 foram realizados em duplicata, sendo que o ponto central foi reproduzido seis vezes. Para melhor reprodutibilidade dos cultivos, esta etapa foi realizada com quatro reatores operando simultaneamente, conforme ilustra Figura 17.

Tabela 8: Variáveis de entrada ( $V_e$ ) em arranjo fatorial completo  $2^2$  com ponto central.

| Parâmetro   | Nível |     |     |
|---|-------|-----|-----|
|   | -1    | 0   | +1  |
| Concentração de nitrato de sódio [ $\text{mg L}^{-1}$ ] | 75    | 150 | 225 |
| Concentração de acetato de sódio [ $\text{g L}^{-1}$ ]  | 2     | 4   | 6   |

Fonte: Produção do próprio autor

Figura 17: Foto dos fotobiorreatores empregados na segunda etapa do trabalho.



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 9: Condições experimentais do planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central

| Experimento | Concentração de acetato<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Concentração de nitrato<br>[mg L <sup>-1</sup> ] |
|-------------|---|--|
| 1           | 225(+1)   | 6(+1)  |
| 2           | 75(-1)  | 6(+1)  |
| 3           | 225(+1)   | 2(-1)  |
| 4           | 75(-1)  | 2(-1)  |
| 5           | 150(0)  | 4(0)   |

Fonte: Produção do próprio autor

### 3.5.3 Etapa III: Estudo de diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ) como fonte de iluminação no cultivo das microalgas

Foi selecionada a melhor condição de cultivo da microalga *D. salina*, das etapas anteriores, para dar continuidade à terceira etapa do trabalho. Esta etapa teve com principal finalidade avaliar o uso de lâmpadas de LED de diferentes  $\lambda$ s no cultivo da microalga *D. salina* em fotobiorreatores coluna de bolhas de 10 L, aerados com vazão de 6 L min<sup>-1</sup>, por um compressor Boyu Acq 007.

Para a análise estatística dos dados, foi empregado o planejamento de mistura simplex com centroide, que prevê os experimentos descritos na Tabela 10. Nesta tabela estão indicados os valores das  $V_e$  ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ). Estas  $V_e$  representam a proporção de cada  $\lambda$  ( $X_1$  – azul,  $X_2$  – vermelho,  $X_3$  - verde) usado na iluminação.

Tabela 10: Condições experimentais do planejamento de mistura simplex com centroide para três componentes de mistura

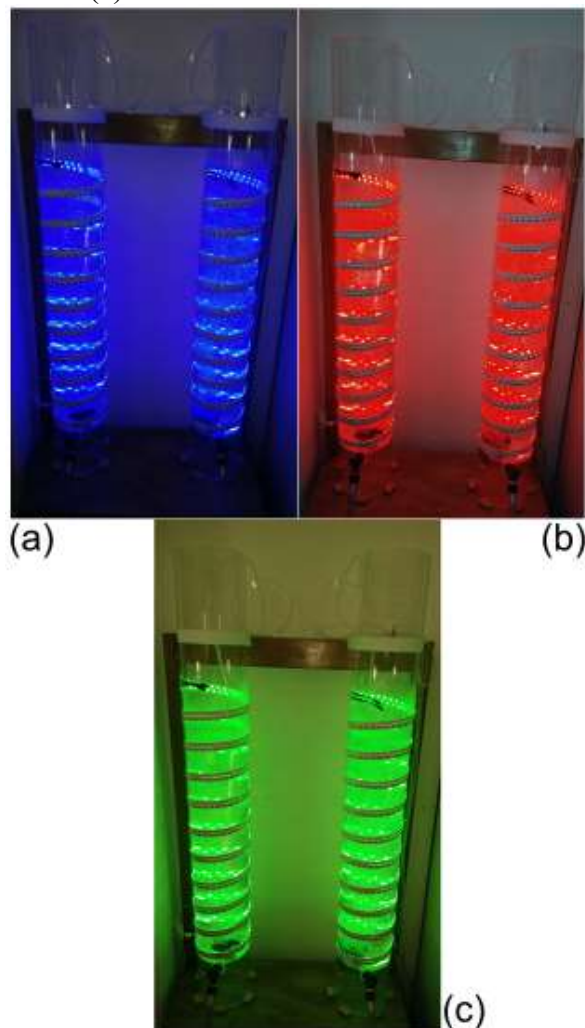
| Experimento | $X_1$ (Azul)  | $X_2$ (vermelha) | $X_3$ (verde) |
|-------------|---------------|------------------|---------------|
| 1           | 1             | 0                | 0             |
| 2           | 0             | 1                | 0             |
| 3           | 0             | 0                | 1             |
| 4           | $\frac{1}{2}$ | $\frac{1}{2}$    | 0             |
| 5           | $\frac{1}{2}$ | 0                | $\frac{1}{2}$ |
| 6           | 0             | $\frac{1}{2}$    | $\frac{1}{2}$ |
| 7           | $\frac{1}{3}$ | $\frac{1}{3}$    | $\frac{1}{3}$ |

Fonte: Produção do próprio autor

Observa-se na Tabela 10 as condições experimentais que utilizam apenas um  $\lambda$ : iluminação azul, (1, 0, 0),  $X_1=1$ ,  $X_2=X_3=0$ ; iluminação vermelha, (0, 1, 0),  $X_2=1$ ,  $X_1=X_3=0$ ; iluminação verde, (0, 0, 1),  $X_3=1$ ,  $X_1=X_2=0$ . Também foram avaliadas diferentes combinações de comprimento de onda, com proporção igual entre eles: mistura azul e verde ( $\frac{1}{2}$ , 0,  $\frac{1}{2}$ ),  $X_1=X_3=\frac{1}{2}$ ,  $X_2=0$ ; mistura azul vermelho ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 0),  $X_1=X_2=\frac{1}{2}$ ,  $X_3=0$ ; mistura vermelho verde (0,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{2}$ ),  $X_2=X_3=\frac{1}{2}$ ,  $X_1=0$ . O ponto central do planejamento prevê uma condição que utiliza os três  $\lambda$ s em igual proporção, formando a luz branca ( $X_1=X_2=X_3=\frac{1}{3}$ ), ou simplesmente ( $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{3}$ ). A Figura 18 mostra imagens dos fotobiorreatores em operação com diferentes combinações de luz.

Todos os experimentos da Tabela 10 foram realizados em duplicata, visando verificar a influência de cada uma destas cores na produtividade de biomassa celular ( $P_b$ ), lipídica ( $P_o$ ), de  $\omega_3$  e  $\omega_6$  da microalga *D. salina*.

Figura 18: Foto dos fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas de 10 L iluminados por LEDs nas cores: (a) azul; (b) vermelho e (c) verde.



### 3.6 COLHEITA DA BIOMASSA

Ao final de cada etapa de cultivo a biomassa foi recuperada por floculação, empregando-se uma solução de cloreto férrico,  $\text{FeCl}_3$  ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) ou sulfato de alumínio,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) como agente floculante. Uma vez decantada a biomassa, o volume do meio de cultivo pode ser removido por sifonação, reduzindo trabalho operacional e custos para as etapas posteriores.

Após a etapa de floculação foi realizada filtração a vácuo ou centrifugação (3000 rpm por 10 min) para completa recuperação da biomassa.

Para cada cultivo, com auxílio de uma balança de umidade da marca Marte<sup>®</sup> modelo ID-50, foram obtidos os valores de fração seca,  $f_s$  (fração de biomassa seca em relação ao total de biomassa).

Foi então determinada a produtividade de biomassa ( $P_b$ ) do cultivo, segundo a equação 20, em que:  $B_u$  é o total de biomassa úmida obtido no fotobiorreator [mg];  $f_s$  é a fração seca;  $T_c$  é o tempo de cultivo [dias] e  $V$  é o volume [L] do reator. O valor de produtividade foi determinado em  $[\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}]$ .

$$P_b = \frac{B_u * f_s}{T_c * V} \quad (20)$$

A biomassa colhida foi mantida congelada, antes de ser submetida ao processo de extração de óleo.

### 3.7 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS

Os lipídeos foram extraídos da biomassa utilizando-se um método modificado de Folch, Lees e Stanley (1956). Para cada 2 g de biomassa úmida (50 a 60% de umidade) foram empregados 10,2 mL de metanol e 9,7 mL de clorofórmio e a amostra foi sonicada por 25 minutos, em banho ultrassônico. Após este período foram adicionados 9,7 mL de clorofórmio e a mistura foi sonicada por mais 25 min. Ao final do processo, a mistura foi transferida para um funil de separação, adicionando-se água para facilitar a separação das fases apolar (lipídica) e polar (água, metanol).

Após a separação das fases, o extrato lipídico obtido foi filtrado, para a remoção da biomassa, e seco em rota evaporador, para a remoção dos solventes. Em seguida, a amostra foi transferida para a estufa (60°C) até obtenção de massa constante.

A quantificação dos lipídeos foi feita pela fração de lipídeos em [g de lipídeos /100g de biomassa],  $f_o$ , e pela produtividade de lipídeos,  $P_o$ .  $f_o$  foi obtido conforme descrito na Equação 21. Para a obtenção da  $P_o$ , a  $P_b$  foi multiplicada pela fração de lipídeos,  $f_o$ .

$$f_o = \frac{\text{Massa final lipídeos}}{\text{Total de biomassa seca}} * 100 \quad (21)$$

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL LIPÍDICO

O óleo microalgal obtido após a etapa de extração da biomassa foi caracterizado quanto a algumas propriedades de interesse para o trabalho, tais como: viscosidade, índice de iodo, índice de acidez e perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (CG). Todos descritos detalhadamente a seguir:

- ..... Viscosidade: A viscosidade foi determinada usando um viscosímetro Brookfield® equipado com cone CP52, utilizando 1 mL de amostra a 50°C (DA RÓS *et al.*, 2013).

- ..... Índice de iodo (Ii): O índice de iodo foi determinado segundo o método da AOCS, (2004). Primeiramente foi preparada uma mistura alcoólica (base etanol) 1:1 das seguintes soluções: 1) solução de 5% m/v de  $I_2$ ; 2) solução 6% m/v de  $HgCl_2$ . Foram pesadas aproximadamente 0,25 g de óleo ( $M_{amostra}$ ) em um erlenmeyer de 250 mL, misturando-se 10 mL de clorofórmio e 20 mL da mistura alcoólica preparada anteriormente. Após a mistura, o meio foi deixado para reagir no escuro por 30 min. Para interromper a reação foram adicionados 100 mL de água destilada seguido de 10 mL de solução saturada de KI. O excesso de  $I_2$  não reagido foi titulado com solução padronizada de tiosulfato 0,1 eq L<sup>-1</sup> em presença de amido como indicador. Para o branco foi realizado o mesmo procedimento, porém sem adição do óleo. O índice de iodo foi calculado de acordo com a equação 22, em que:  $V_b$  e  $V_{am}$  são volumes do branco e da amostra [L], respectivamente;  $C_{tio}$  é a concentração do tiosulfato [eq L<sup>-1</sup>],  $MMI_2$  é a massa molar do  $I_2$  (253,8089 g mol<sup>-1</sup>) e  $M_{amostra}$  é a massa da amostra de óleo [g].



$$I_i \left[ \frac{\text{gI}_2}{\text{g}} \right] = \frac{(V_b - V_{am}) * C_{\text{tio}} * MM_{\text{I}_2} * 0,1}{2 * M_{\text{amostra}}} \quad (22)$$

•..... Índice de acidez: O índice de acidez foi determinado pelo método da AOCS, 2004, utilizando 0,2 g de óleo. A amostra foi pesada em erlenmeyer de 250 mL e dissolvida em uma mistura 2:1 de dimetil éter e etanol. A mistura foi titulada com solução padronizada 0,02 mol L<sup>-1</sup> de KOH, usando fenolftaleína como indicador. O índice de acidez (Ia) foi determinado pela equação 23, em que: V<sub>b</sub> e V<sub>am</sub> são volumes do branco e da amostra [L], respectivamente; C<sub>KOH</sub> é a concentração do KOH [mol L<sup>-1</sup>]; MM<sub>KOH</sub> é a massa molar do hidróxido de potássio (56,1056 g mol<sup>-1</sup>) e M<sub>amostra</sub> é a massa da amostra de óleo [g].

$$I_a \left[ \frac{\text{mgKOH}}{\text{g}} \right] = \frac{(V_{am} - V_b) * C_{\text{KOH}} * MM_{\text{KOH}}}{M_{\text{amostra}}} \quad (23)$$

•..... Perfil de ácidos graxos: Para a análise do perfil de ácidos graxos, inicialmente a amostra foi submetida à uma etapa de metilação com solução metílica de BF<sub>3</sub>. A mistura foi mantida em ebulição por 10 minutos e, em seguida, adicionou-se 5 mL de heptano, mantendo-se em ebulição por mais 2 min. Ao final do processo foram adicionados 15 mL de solução saturada de NaCl para promover a separação das fases. A fase superior, contendo os ácidos graxos foi transferida para um vial, adicionando-se heptano e sulfato de sódio anidro, para conservação.

Os FAMES obtidos foram analisados em um cromatógrafo gasoso PerkinElmer<sup>®</sup> - Clarus 580, equipado com: detector por ionização de chama; coluna capilar com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno com fase estacionária 5% difenil 95% dimetilpolioxano (não polar). Os padrões utilizados foram MIX Supelco<sup>®</sup>, com 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), C4-C24.

### 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas com os softwares “Design Expert” (versão 6.0, Stat-Ease Corporation, USA), “Statistica” (versão 8.0, Statsoft Inc., USA) e “Minitab” (versão 10.0, Minitab Inc., USA). Também, para a otimização *desirability* foi utilizado o Minitab.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com intuito de facilitar a compreensão dos resultados obtidos, o texto a seguir está subdividido seguindo a sequência das 3 etapas realizadas no presente trabalho, em ordem cronológica de realização.

### 4.1 ETAPA I: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA PRODUTIVIDADE CELULAR E LIPÍDICA DAS MICROALGAS

Conforme mencionado anteriormente, o principal objetivo desta primeira etapa do trabalho foi comparar a efetividade do acetato e do bicarbonato de sódio, sobre a produtividade celular e lipídica das microalgas estudadas. Estas fontes de carbono foram escolhidas devido às vantagens já mencionadas anteriormente (item 2.1.2).

Além da fonte de carbono, também foi verificada a influência do nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), importante nutriente empregado como fonte de nitrogênio nos cultivos (RASDI; QIN, 2015; SAN PEDRO *et al.*, 2014; SUNG *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2014). Levando-se em consideração que nesta etapa o objetivo foi exploratório, sem preocupação com a interação entre os fatores, utilizou-se uma matriz ortogonal Taguchi  $L_4$ , com intuito de reduzir o número de experimentos.

Os resultados de produtividade de biomassa e de lipídeos para cada microalga estão sumarizados na Tabela 11 e Tabela 12. Para melhor visualização, estes mesmos resultados estão ilustrados na Figura 19.

Tabela 11: Resultados de Pb, Po e razão S/N da Po da *N. gaditana* da matriz ortogonal Taguchi  $L_4$

| Exp | Acetato<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Bicarb.<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Nitrato<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | Pb<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | Po<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | S/N <sup>2</sup><br>Po |
|-----|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|---|------------------------|
| 1   | 0                               | 0                               | 25                               | 28,51 ±0,06                                   | 1,44 ±0,06                                    | 3,13                   |
| 2   | 0                               | 2                               | 75                               | 68,58 ±1,25                                   | 2,24 ±0,16                                    | 6,97                   |
| 3   | 2                               | 0                               | 75                               | 88,30 ±5,13                                   | 10,25 ±1,02                                   | 20,17                  |
| 4   | 2                               | 2                               | 25                               | 111,82 ±0,07                                  | 3,60 ±1,06                                    | 10,73                  |

Fonte: Produção do próprio autor

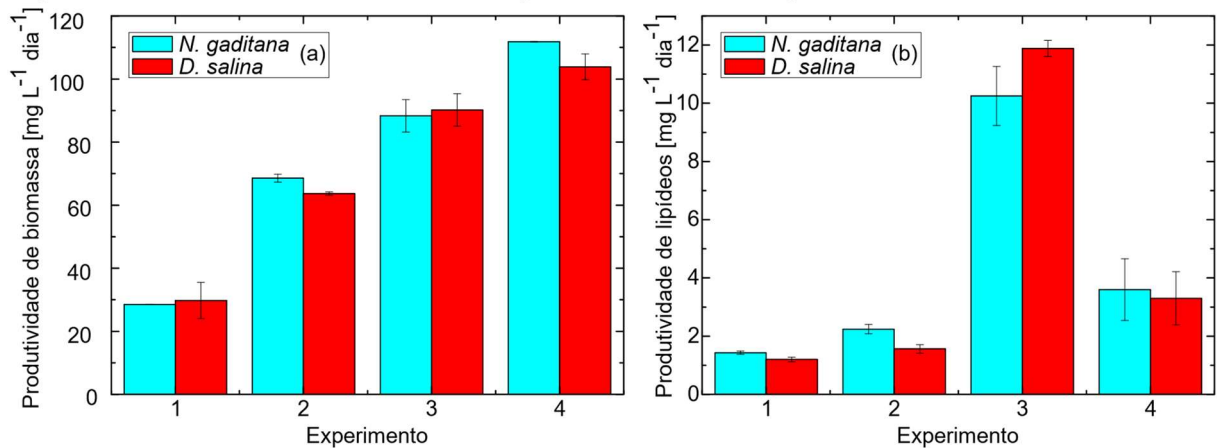
<sup>2</sup> S/N calculado para o caso maior é melhor, para aumentar o resultado da Vs (Po)

Tabela 12: Resultados de Pb, Po e razão S/N da Po da *D. salina* da matriz ortogonal Taguchi L<sub>4</sub>

| Exp | Acetato<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Bicarb.<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Nitrato<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | Pb<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | Po<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | S/N <sup>3</sup><br>Po |
|-----|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|---|------------------------|
| 1   | 0                               | 0                               | 25                               | 29,76 ±5,72                                   | 1,20 ±0,08                                    | 1,55                   |
| 2   | 0                               | 2                               | 75                               | 63,63 ±0,58                                   | 1,57 ±0,15                                    | 3,84                   |
| 3   | 2                               | 0                               | 75                               | 90,19 ±5,12                                   | 12,12 ±0,28                                   | 21,67                  |
| 4   | 2                               | 2                               | 25                               | 103,85 ±4,07                                  | 3,31 ±0,92                                    | 10,03                  |

Fonte: Produção do próprio autor

Figura 19: Resultados obtidos de Pb Po para as duas microalgas estudadas



Fonte: Produção do próprio autor

Conforme nota-se na Tabela 11 e na Figura 19, os resultados foram semelhantes entre as microalgas estudadas, tanto em termos de Pb quanto para a Po. Em termos de biomassa celular, o experimento 1 foi o que apresentou a menor produtividade (28,51 e 29,76 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para a *N. gaditana* e a *D. salina*, respectivamente), provavelmente devido à ausência de ambas as fontes de carbono e o baixo teor de nitrato.

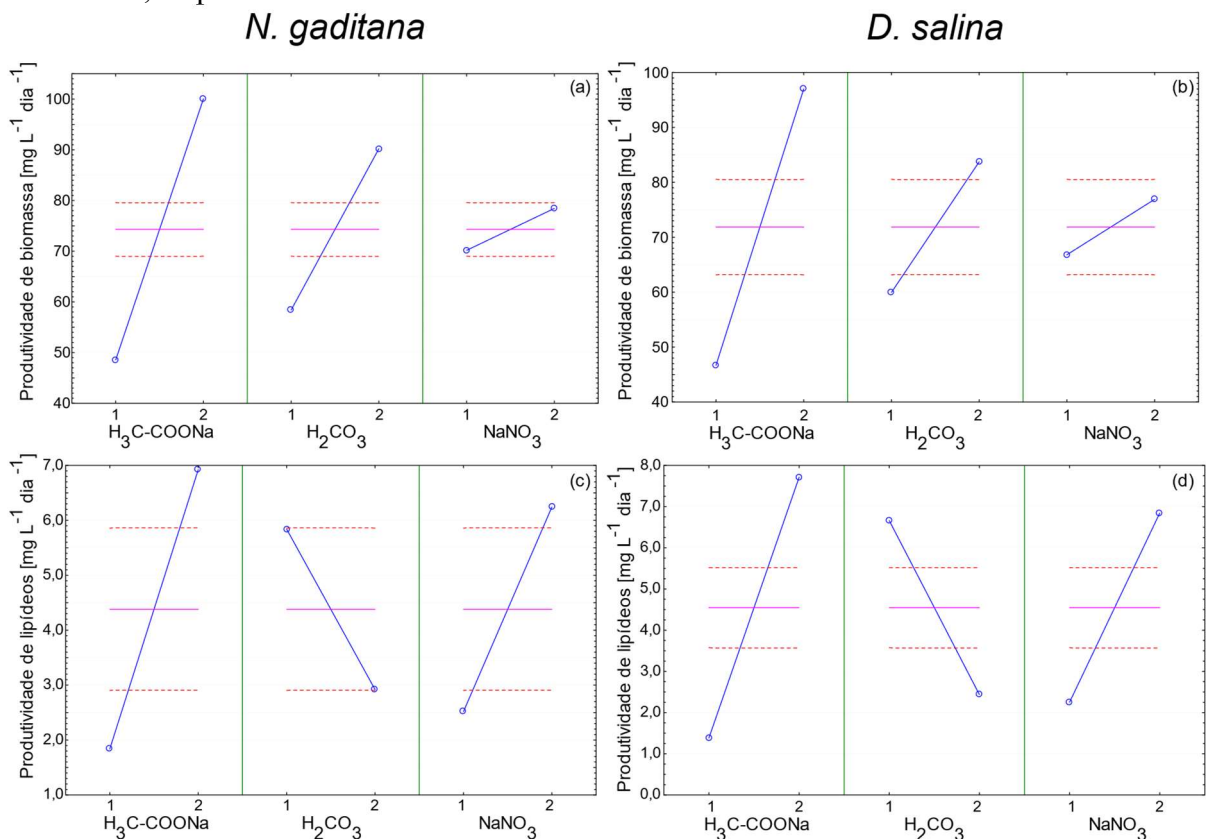
Os experimentos 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes, em termos de biomassa, sendo que o experimento 3 resultou em uma Pb um pouco maior (88,30 e 90,19 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para a *N. gaditana* e a *D. salina*, respectivamente). No experimento 4, embora tenha sido empregado uma menor concentração de nitrato, o uso combinado de ambas as fontes de carbono resultou em um valor elevado para Pb (111,82 e 103,85 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para *N. gaditana* e *D. salina*, respectivamente).

<sup>3</sup> S/N calculado para o caso maior é melhor, para aumentar o resultado da Vs (Po)

Com relação à produtividade de lipídeos, os experimentos 1, 2 e 4 apresentaram resultados semelhantes entre si, sendo estes relativamente baixos. Embora o experimento 4 tenha apresentado elevada produção de biomassa, sua produção de lipídeos foi baixa. Por outro lado, o experimento 3, com alto teor de nitrogênio e presença de apenas acetato como fonte de carbono, se destacou com uma maior Po (10,25 e 12,12 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para a *N. gaditana* e a *D. salina*, respectivamente). Esse resultado indica que o acetato de sódio se destaca como fonte de carbono para aumentar a Po.

A partir da análise estatística dos dados apresentados na Tabela 11, obteve-se como resultado os gráficos dos efeitos das variáveis de entrada, Ve, representados na Figura 20. As análises de variância (ANOVA) das produtividades de óleo das microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*, estão descritas na Tabela 13 e na Tabela 14, respectivamente.

Figura 20: Gráficos dos efeitos das Ve sobre a Pb (a e b) e Po (c e d) das microalgas *N. gaditana* e *D. salina*, respectivamente.



Fonte: STATSOFT (2018).

Analisando-se a Figura 20, percebe-se que o aumento de qualquer uma das Ve resultou em um aumento na Pb para ambas as linhagens estudadas. Com relação à Po, analisando-se os dados da ANOVA (Tabela 13 e Tabela 14), percebe-se que todas as Ve (acetato, bicarbonato e

nitrito) foram relevantes ao processo. Isto é notável devido aos elevados fatores F e baixos p-valor (menores que 5%). Um alto valor de F significa que o fator estudado provoca maiores variações na Vs do que o erro. Por exemplo, se  $F=3$ , o fator provoca uma variação na Vs três vezes maior que o erro. O p-valor tem a ver com a probabilidade de se obter os resultados, supondo que o fator não é relevante. Quando o p-valor é muito baixo, a probabilidade da variabilidade dos dados ser aleatória é muito baixa, dando evidências da relevância do fator.

Tabela 13: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com a matriz ortogonal Taguchi L<sub>4</sub> para o cultivo da microalga *N. gaditana*.

| Efeito      | SQ    | Gl | QM    | F     | p (%) |
|-------------|-------|----|-------|-------|-------|
| Acetato     | 51,71 | 1  | 51,71 | 47,39 | 0,233 |
| Bicarbonato | 17,05 | 1  | 17,05 | 15,62 | 1,677 |
| Nitrato     | 27,75 | 1  | 27,75 | 25,43 | 0,727 |
| Erro        | 4,36  | 4  | 1,09  |       |       |

Fonte: STATSOFT (2018).

Tabela 14: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com a matriz ortogonal Taguchi L<sub>4</sub> para o cultivo da microalga *D. salina*.

| Efeito      | SQ    | Gl | QM    | F      | p (%) |
|-------------|-------|----|-------|--------|-------|
| Acetato     | 80,14 | 1  | 80,14 | 169,95 | 0,020 |
| Bicarbonato | 35,70 | 1  | 35,70 | 75,71  | 0,096 |
| Nitrato     | 42,14 | 1  | 42,14 | 89,36  | 0,070 |
| Erro        | 1,89  | 4  | 0,47  |        |       |

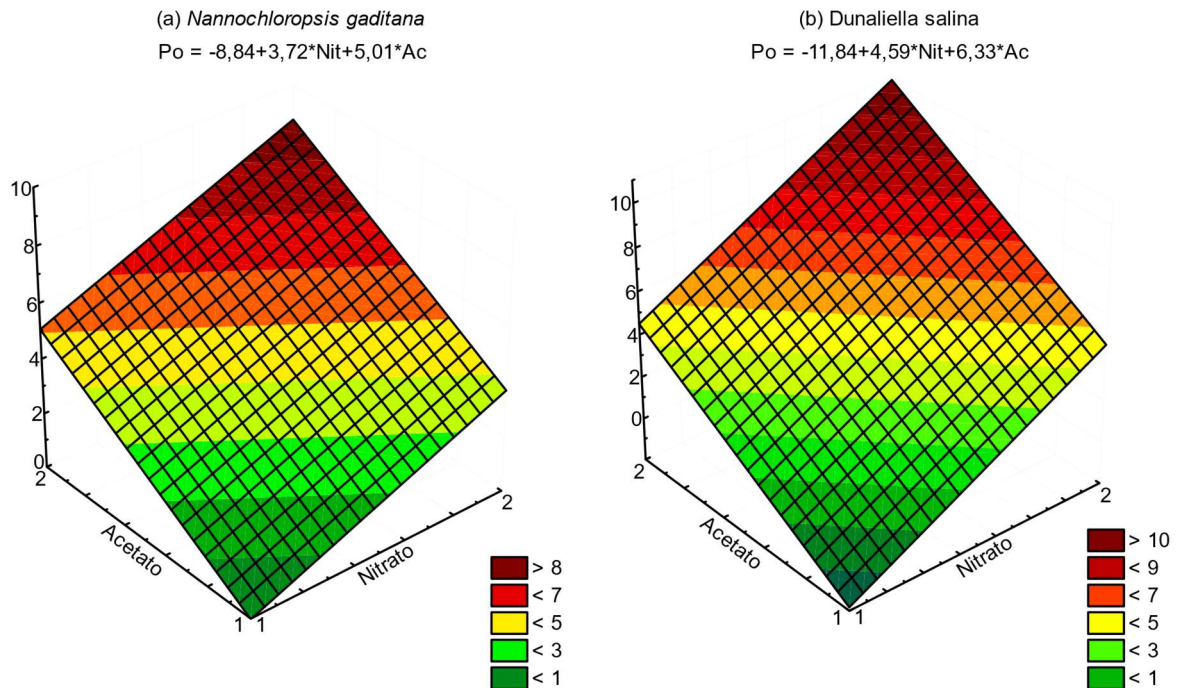
Fonte: STATSOFT (2018).

Apesar da variável bicarbonato ter sido estatisticamente significativa para o cultivo de ambas as microalgas, o aumento de sua concentração resultou em uma redução na produtividade de lipídeos, conforme mostra as Figura 20(c) e Figura 20(d). Estes gráficos ilustram uma maior Po para ambas as microalgas, quando o bicarbonato não foi utilizado no cultivo (nível baixo).

Por outro lado, o aumento das concentrações de nitrato e acetato favoreceram a produção de lipídeos, conforme pode ser visualizado na Figura 20 (c) e na Figura 20 (d). Esses dados também podem ser observados na Figura 21, que modelam as Po para ambas as microalgas, em função das variáveis nitrato e acetato. Estes gráficos foram obtidos a partir das Funções

empíricas 20 e 21, onde  $Po$  (Na) e  $Po$  (Du) são as produtividades de lipídeos da *N. gaditana* e *D. salina*, respectivamente, e Nit e Ac são nitrato e acetato, em variável código.

Figura 21: Superfície de resposta para a produtividade lipídica [ $\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ] para o cultivo das microalgas *N. gaditana* (a) e *D. salina* (b) mostrando os efeitos das variáveis: acetato e nitrato.



Fonte: STATSOFT (2018).

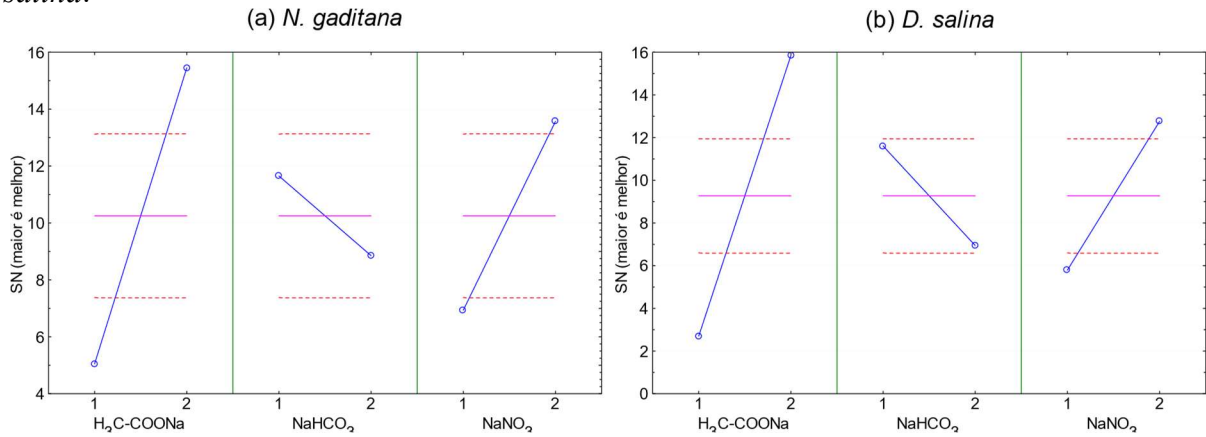
$$Po (Na) = -8,84 + 5,09Ac + 3,72Nit \quad (20)$$

$$Po (Du) = 1,39 + 6,33Ac + 4,59Nit \quad (21)$$

Com base nestes resultados, para as próximas etapas do trabalho, optou-se em utilizar somente o acetato como fonte de carbono. O melhor ajuste obtido nesta etapa foi considerado o ponto de partida do estudo para a etapa seguinte do trabalho ( $75 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  de nitrato e acetato, respectivamente), sendo denominada segunda etapa.

Vale ressaltar que esse ajuste também gerou os maiores valores de razão sinal ruído, S/N, para as microalgas estudadas. Isto pode ser evidenciado tanto pela Tabela 11, quanto pelos gráficos das médias do S/N da  $Po$ , ilustrados na Figura 22. Esta característica é favorável, pois ao se ajustar a concentração do acetato e do bicarbonato no nível alto, não somente a produtividade do cultivo será maior, como também ele será mais robusto. Ou seja, nestas condições, o processo é menos suscetível a ruídos.

Figura 22: Gráficos dos efeitos das  $V_e$  sobre a razão S/N da Po da (a) *N. gaditana* e (b) *D. salina*.



Fonte: STATSOFT (2018).

#### 4.2 ETAPA II: ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ACETATO E NITRATO DE SÓDIO NO CULTIVO DAS MICROALGAS *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* E *DUNALIELLA SALINA*

Com base nos resultados obtidos na etapa I, a segunda etapa do trabalho visou um estudo mais detalhado da influência do acetato e do nitrato de sódio sobre a produtividade das microalgas *D. salina* e *N. gaditana*. Para isto, foi empregado um planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central, que permite a determinação do efeito das interações. Os resultados obtidos, para ambas as microalgas, ao longo desta etapa estão sumarizados na Tabela 15.

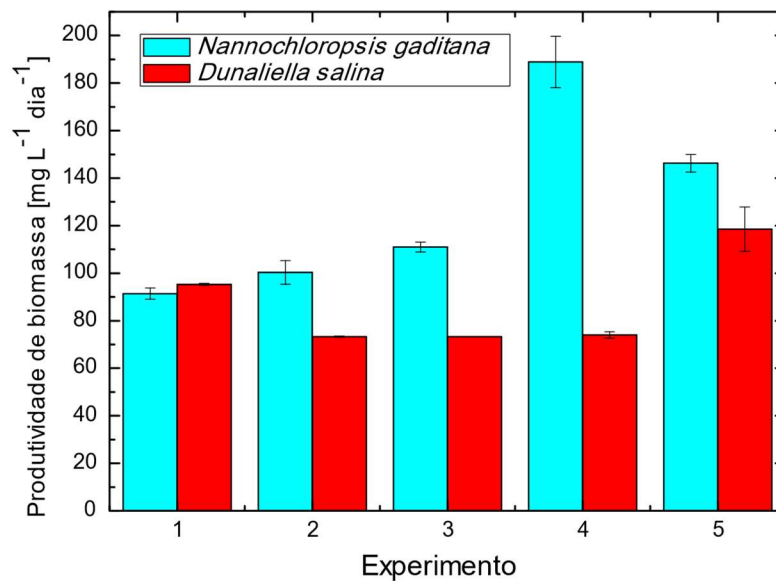
Tabela 15: Produtividade de biomassa (Po) obtida pelo cultivo das microalgas *N. gaditana* e *D. salina* do planejamento fatorial completo  $2^2$ .

| Exp | Conc. de acetato [g L <sup>-1</sup> ] | Conc. de nitrato [mg L <sup>-1</sup> ] | <i>N. gaditana</i>                         |        | <i>D. salina</i>                           |       |
|-----|---------------------------------------|--|--|--------|--|-------|
|     |                                       |  | Pb [mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] |        | Pb [mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] |       |
| 1   | 2(-)                                  | 75(-)                                  | 91,41                                      | ±2,40  | 95,29                                      | ±0,38 |
| 2   | 6(+)                                  | 75(-)                                  | 100,33                                     | ±4,94  | 73,31                                      | ±0,23 |
| 3   | 2(-)                                  | 225(+)                                 | 111,02                                     | ±2,02  | 73,29                                      | ±0,01 |
| 4   | 6(+)                                  | 225(+)                                 | 188,93                                     | ±10,78 | 73,97                                      | ±1,34 |
| 5   | 4(0)                                  | 150(0)                                 | 146,26                                     | ±3,67  | 118,5                                      | ±9,34 |

Fonte: Produção do próprio autor

Pela análise preliminar dos resultados, percebe-se divergência no comportamento das microalgas estudadas. A *N. gaditana* apresentou maior variação entre os resultados experimentais, enquanto os resultados da *D. salina* foram similares entre si, com exceção do ponto central, com maiores valores de produtividade celular, Pb.

Figura 23: Produtividade de biomassa(Pb) obtida pelo cultivo das microalgas *N. gaditana* e *D. salina* do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.



Fonte: Produção do próprio autor

#### 4.2.1 Análise estatística dos resultados de produtividade de biomassa da microalga *Nannochloropsis gaditana*

A Figura 21 mostra o gráfico de Pareto para os valores de Pb da microalga *N. gaditana*, no qual as barras representam os efeitos padronizados dos fatores analisados, bem como os efeitos padronizados da interação.

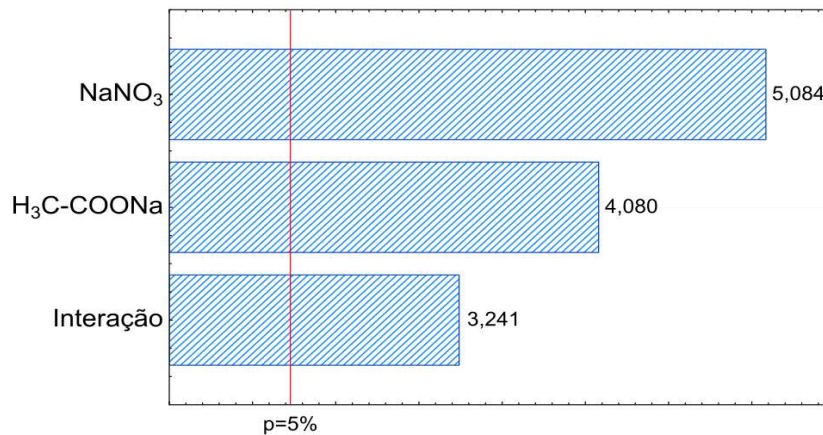
O efeito de um fator mede a diferença da média dos resultados quando este fator é ajustado no nível alto, pela média dos resultados quando este mesmo fator é ajustado no nível baixo. Ou seja, quanto maior o efeito de um fator, em módulo, maior será a influência deste sobre a Vs. Isto ocorre, pois a alteração do ajuste deste fator altera significativamente a Vs. O sinal do efeito também é relevante para a análise. Se o efeito de um fator for positivo, o ajuste deste fator no nível alto aumenta a Vs. Por outro lado, se for negativo, o ajuste no nível baixo é que irá resultar em maiores resultados na Vs.



Pela análise do gráfico de Pareto (Figura 21) foi possível verificar que as ambas as variáveis estudadas, tanto o acetato como o nitrato, foram significantes sobre a Pb. Uma vez que ambos seus efeitos foram positivos, as variáveis devem ser empregadas no nível alto para aumentar os valores de Pb.

A interação também foi considerada relevante, com um efeito positivo sobre a Pb. Ou seja, se for aumentado, simultaneamente, a concentração do nitrato e do acetato, o efeito observado sobre a Pb vai ser maior que a soma dos efeitos de aumentar as concentrações destes nutrientes de forma isolada.

Figura 24: Gráfico de Pareto da Pb para um nível de confiança de 95% ( $\alpha=5\%$ ) no cultivo da microalga *N. gaditana*.



Fonte: STATSOFT (2018).

Outra forma de verificar a relevância dos fatores estudados é pela análise de variância do modelo (ANOVA). A Tabela 16 ilustra a análise dos resultados de Pb obtidos nos cultivos da *N. gaditana*. Os resultados indicam uma forte relevância das variáveis de entrada (Ve), bem como da interação entre elas, com elevados valores de F e baixos p-valores ( $p<5\%$ ).

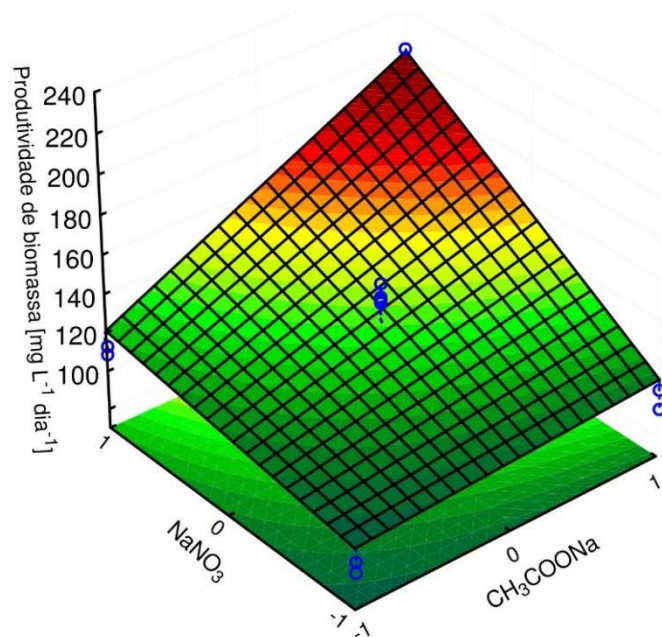
A Figura 25 ilustra a superfície de resposta obtida de acordo com os valores de Pb da microalga *N. gaditana* em função das variáveis estudadas: nitrato e acetato. O modelo empírico é descrito pela Equação 24, em que Ac e Nit são o acetato e o nitrato em variável código. Esta modelagem apresentou um R-sqr de 0,84 e R-adj de 0,79. Analisando-se a Figura 25, percebe-se que o melhor ajuste, dentre as combinações estudadas, foi utilizando ambos os fatores no nível alto (225 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio e 6 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio).

Tabela 16: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial completo  $2^2$  da Pb da segunda etapa da *N. gaditana*.

| Efeito    | SQ       | Gl | QM      | F      | p (%)               |
|-----------|----------|----|---------|--------|---------------------|
| Curvatura | 1868,13  | 1  | 1868,13 | 42,40  | 0,01                |
| Acetato   | 3769,72  | 1  | 3769,72 | 85,56  | $7 \cdot 10^{-4}$   |
| Nitrato   | 5854,70  | 1  | 5854,70 | 132,88 | $1 \cdot 10^{-4}$   |
| Interação | 2379,81  | 1  | 2379,81 | 54,01  | $4,3 \cdot 10^{-3}$ |
| Erro      | 396,55   | 9  | 44,061  |        |                     |
| Total     | 14268,92 | 13 |         |        |                     |

Fonte: STATSOFT (2018).

Figura 25: Perfil da produtividade de biomassa (Pb) obtido do planejamento fatorial completo  $2^2$  da *N. gaditana*.



Fonte: STATSOFT (2018).

$$Pb = 132,92 + 21,71Ac + 27,05Nit + 17,25Ac * Nit \quad (24)$$

Apesar do modelo apresentado na Figura 25 ser de primeira ordem, nota-se que este não gera um gráfico plano, como ocorreu na etapa I. Observa-se uma distorção na superfície, especialmente na proximidade do ajuste (+,+). Esta distorção está relacionada com a elevada influência da interação entre os fatores estudados. Em termos matemáticos, a interação aparece

como um fator do tipo  $c \cdot X_1 \cdot X_2$  no modelo. Quanto maior o efeito da interação sobre a  $V_s$ , maior a constante  $c$  e, conseqüentemente, maior a curvatura da superfície gerada pelo modelo.

A despeito da grande relevância dos fatores observados, também se obteve alta relevância da curvatura no teste da ANOVA (Tabela 16). Desta forma, pode-se supor que o modelo quadrático poderia obter melhor ajuste da região estudada. O coeficiente de correlação obtido com o atual modelo foi de 0,841. Um modelo quadrático poderia obter melhor ajuste dos dados, porém já ficou evidente que o aumento da  $P_b$  foi obtido aumentando a concentração de ambos os nutrientes, revelando um valor de  $188,93 \pm 10,78 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , obtido no ponto (+,+).

#### 4.2.2 Análise estatística dos resultados de produtividade de biomassa da microalga *D. salina*

Com relação à microalga *D. salina*, os resultados obtidos de  $P_b$  resultantes dos cultivos conduzidos de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$  foram similares entre si. Entretanto, os valores mais elevados de  $P_b$  foram obtidos pelos ensaios realizados na condição do ponto central, conforme mostra a Figura 23.

Embora o experimento (-,-) tenha apresentado valor superior as demais condições propostas pelo planejamento  $2^2$ , seu resultado foi inferior aos alcançados pelo ponto central. Na etapa I do trabalho (item 4.1), a microalga *D. salina* apresentou grandes variações na  $P_b$  em função da variação da concentração de acetato e nitrato. Contudo, nessa nova região estudada, correspondente a etapa II, observou-se uma menor variação dos resultados, apesar da maior variação nos valores das  $V_e$  (acetato e nitrato).

A análise estatística dos resultados está representada pelo gráfico de Pareto (Figura 26), ANOVA (Fonte: Statsoft (2018).

**Tabela 17)**, superfície de resposta (Figura 27), e o modelo matemático obtido (Equação 25).

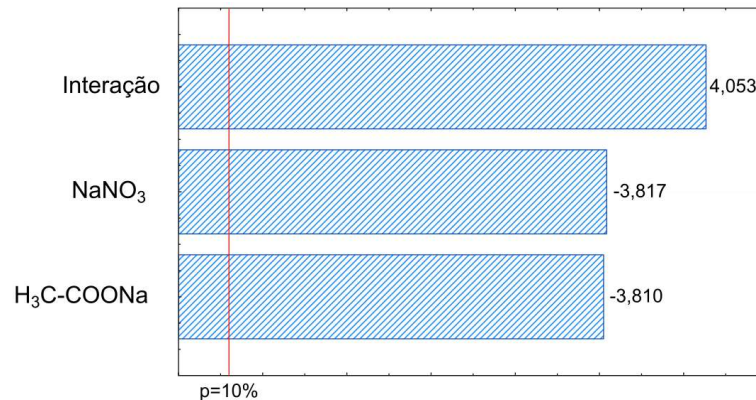
$$P_b = 93,83 - 5,33Ac - 5,34Nit + 5,67Ac \cdot Nit \quad (25)$$

Pelos resultados obtidos da análise estatística, percebe-se que para um nível de significância de 5%, igual ao aplicado para a *N. gaditana*, apenas a curvatura do modelo foi significativa. Por outro lado, quando se aumentou a possibilidade de erro do tipo 1 ( $\alpha$ ) para 10%, (p-valor), todos os fatores foram estatisticamente significativos dentro da região estudada pelo planejamento. Dentre eles, a interação entre a concentração de nitrato e acetato foi a que

apresentou maior relevância sobre a Pb. Esta característica pode ser melhor visualizada pela superfície de resposta, que mostra uma leve curvatura junto ao ponto (-,-) (Figura 27).

Analisando-se a Figura 27 e o gráfico de Pareto, Figura 26, pode-se verificar que o ponto de maior Pb da microalga *D. salina* foi o (-,-). Entretanto, esses resultados foram contraditórios aos apresentados na Figura 20, que indicou maiores valores de Pb para os experimentos realizados no ponto central (0,0). Visando uma melhor compreensão desses resultados foi estabelecido outro critério de análise, para isto a Figura 28 é de grande importância.

Figura 26: Gráfico de Pareto da Pb para um nível de confiança de 90% ( $\alpha=10\%$ ) no cultivo da microalga *D. salina*.



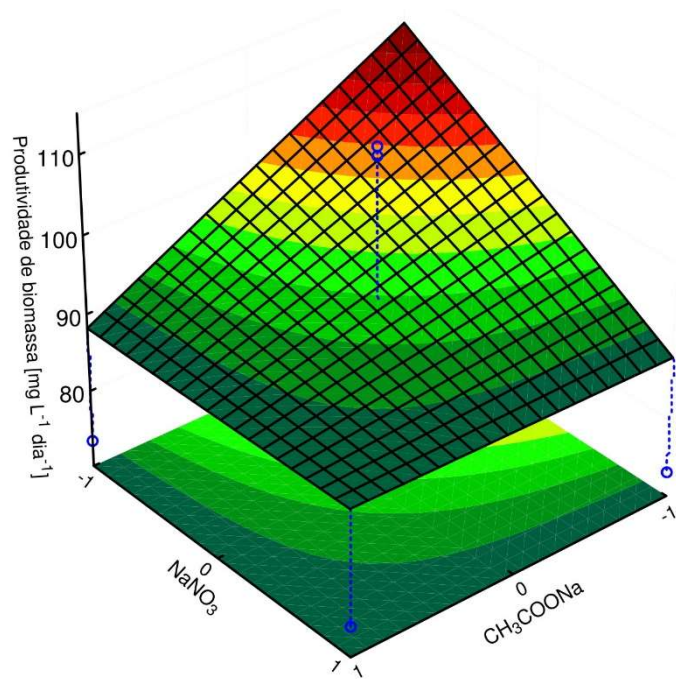
Fonte: STATSOFT (2018).

Tabela 17: Análise de ANOVA dos resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> da Pb da segunda etapa da *D. salina*.

| Efeito    | SQ      | Gl | QM      | F      | p (%) |
|-----------|---------|----|---------|--------|-------|
| Curvatura | 2064,75 | 1  | 2064,75 | 264,23 | 0,38  |
| Acetato   | 113,42  | 1  | 113,42  | 14,51  | 6,25  |
| Nitrato   | 113,85  | 1  | 113,85  | 14,57  | 6,23  |
| Interação | 128,37  | 1  | 128,37  | 16,42  | 5,58  |
| Erro      | 15,63   | 2  | 7,81    |        |       |
| Total     | 2436,02 | 6  |         |        |       |

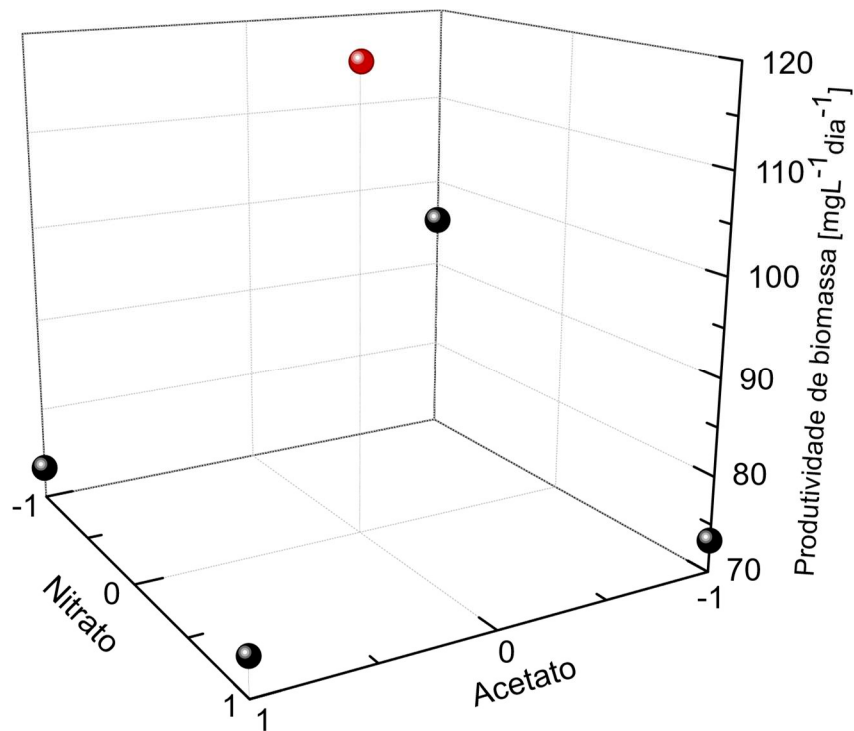
Fonte: STATSOFT (2018).

Figura 27: Perfil da produtividade de biomassa (Pb) obtido do planejamento fatorial completo  $2^2$  da *D. salina*.



Fonte: STATSOFT (2018).

Figura 28: Resultados de Pb obtidos com os cultivos da microalga *D. salina*.



Fonte: Produção do próprio autor

A Figura 28 ilustra um gráfico 3D das médias de Pb das condições experimentais do planejamento  $2^2$  da segunda etapa da *D. salina*. Cada esfera nesta figura representa o resultado de uma condição experimental, sendo o resultado do ponto central destacado em vermelho. Observando-se a figura, percebe-se que o ponto de máxima Pb foi o ponto central, em vermelho, obtendo um resultado de  $118,56 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Esta maior produtividade ilustra um pico de máxima produtividade nas proximidades do ponto (0, 0).

#### 4.2.3 Extração e caracterização do óleo microalgal obtido nas melhores condições previstas pelo planejamento fatorial

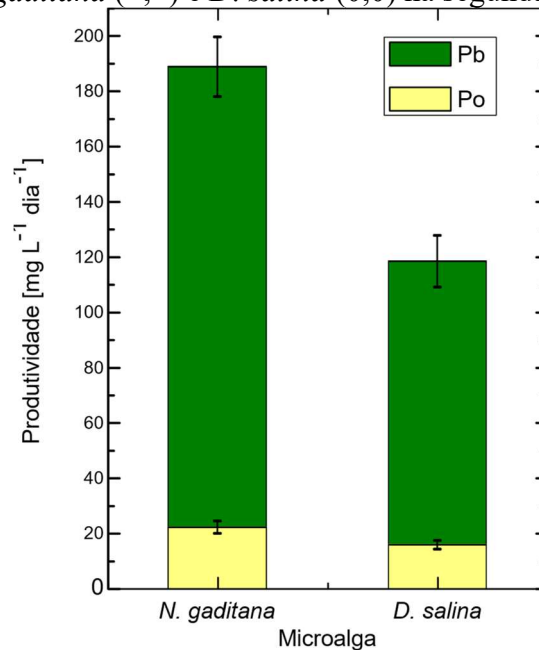
Nas melhores condições estabelecidas pelo planejamento de experimentos, realizado na segunda etapa do trabalho, foram feitas extrações de lipídeos para avaliação da Po e caracterização do óleo microbiano. Para a microalga *N. gaditana*, a melhor condição, (+,+), forneceu valores de  $188,93$  e  $22,37 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  para Pb e Po, respectivamente. A microalga *D. salina*, por sua vez, cultivada na melhor condição (0,0), revelou valores da ordem de  $118,56$  e  $16,03 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  para Pb e Po, respectivamente. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 18 e na Figura 29. Conforme pode ser observado, nota-se uma grande diferença de Pb entre as microalgas estudadas, embora os valores de Po tenham sido similares.

Tabela 18: Produtividades de biomassa (Pb) e lipídica (Po) obtidas nas melhores condições de cultivo das linhagens *N. gaditana* (+,+) e *D. salina* (0,0) na segunda etapa.

| Microalga          | Nitrato<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | Acetato<br>[g L <sup>-1</sup> ] | Pb<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | Po<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|---|
| <i>N. gaditana</i> | 225                              | 2                               | $188,93 \pm 10,78$                            | $22,36 \pm 2,27$                              |
| <i>D. salina</i>   | 150                              | 4                               | $118,5 \pm 9,36$                              | $16,03 \pm 1,56$                              |

Fonte: Produção do próprio autor

Figura 29: Produtividades de biomassa (Pb) e lipídica (Po) obtidas nas melhores condições de cultivo das linhagens *N. gaditana* (+,+) e *D. salina* (0,0) na segunda etapa.



Fonte: Produção do próprio autor

O Quadro 1 sumariza as principais referências obtidas, quando se pesquisou as palavras chave *Nannochloropsis gaditana* ou *Dunaliella salina* no título dos artigos da literatura. Neste quadro estão os trabalhos que mencionam Po e/ou Pb, informando o fotobiorreator e o meio de cultivo utilizado, além dos melhores resultados reportados de produtividade [mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>].

Com base nos dados apresentados no Quadro 1, pode-se verificar que os resultados obtidos no presente trabalho estão coerentes com os dados reportados pela literatura.

Pedro *et al.* (2015, 2016), cultivaram a microalga *N. gaditana* e o valor de Pb, 190 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, foi similar ao obtido no presente trabalho (188,93 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>). Os autores, por outro lado, utilizaram uma concentração de nitrato muito maior (892,5 mg L<sup>-1</sup>) do que a que foi utilizada no presente trabalho.

Moraes *et al.* (2019) obtiveram resultados semelhantes aos de (PEDRO *et al.*, 2016), também utilizando grandes quantidades de nitrato (4,87mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), na forma de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, e também com a injeção controlada de CO<sub>2</sub> como fonte de carbono nos cultivos e ajuste de pH do meio.

Quadro 1: Valores de Pb e Po encontrados na literatura para as microalgas *N. gaditana* e *D. salina* empregando diferentes condições de cultivo.

| Referência                    | Fotobiorreator   | Meio   | Produtividade máxima obtida   |                    |
|-------------------------------|--|--|---|--------------------|
| (MATOS <i>et al.</i> , 2015)  | Frascos cônicos (3,5 L)<br>Modo: semicontínuo                            | Mistura de Guillard f/2 (75 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> ) e resíduo de planta de dessalinização (30 mg L <sup>-1</sup> de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )<br>Foram testadas as fontes de carbono: glicose, glicerol e glicerina | Po=16,8 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>  | <i>N. gaditana</i> |
| (MITRA <i>et al.</i> , 2015)  | Erlenmeyer (1 L)<br>Modo: batelada                                       | Meio Conway (usando 100 mg L <sup>-1</sup> de KNO <sub>3</sub> )   | Pb=45,01 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Po=14,63 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>                                |                    |
| (PEDRO <i>et al.</i> , 2015)  | <i>Raceway ponds</i> (7,2 m <sup>3</sup> )<br>Modo: batelada e contínuo. | Água marinha suplementada com fertilizantes 10,5mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , equivalente a 892,5 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub>  | Pb=190 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Po=30,4 mgL <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>                                    |                    |
| (PEDRO <i>et al.</i> , 2016)  | Fotobiorreator de placas planas<br>Modo: contínuo                        | Água marinha suplementada com fertilizantes 10,0mM NO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , equivalente a 850 mgL <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub>  | Pb=190 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Po=38,0 mgL <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>                                    |                    |
| (MATOS <i>et al.</i> , 2017)  | Fotobiorreator do tipo tanque (500 mL)<br>Modo: batelada                 | Mistura de Guillard f/2 (75 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> ) e resíduo de planta de dessalinização (30mgL <sup>-1</sup> de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). Foi testado uso de glicose.  | Po=15,9 mgL <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>   |                    |
| (MORAES <i>et al.</i> , 2019) | Fotobiorreator tubular (3m <sup>3</sup> )                                | Água do mar suplementada com nutrientes (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0,8 g L <sup>-1</sup> ). Foi testado a variação da vazão de CO <sub>2</sub>   | Pb=120-240 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Po=27,7-39,5 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>                          |                    |
| (CHEN <i>et al.</i> , 2015b)  | Erlenmeyer<br>Modo: semicontínuo   | Meio Guillard f/2 com segunda etapa restrita em nutrientes   | Po=39,0 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>  | <i>D. salina</i>   |
| (LIU, 2016)                   | Erlenmeyer (250mL)<br>Modo: semicontínuo                                 | Meio Guillard f/2 enriquecido com fertilizante e ureia ao longo do cultivo.  | Po=64,8 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Po=83,1 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Duas linhagens distintas      |                    |
| (MOROWVAT; GHASEMI, 2016)     | Fotobiorreator do tipo tanque (500 mL)<br>Modo: batelada                 | Meio Johnson modificado com 1,8 g L <sup>-1</sup> de KNO <sub>3</sub> , 13 mg L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> e 15 g L <sup>-1</sup> de glicose  | Pb=460 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Meio modificado<br>Pb=180 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup><br>Meio Johnson |                    |

Fonte: Produção do próprio autor

O restante dos artigos relativos à microalga *N. gaditana* obtiveram semelhantes resultados com aqueles apresentados neste trabalho, mostrando a eficiência do presente resultado. Dentre os resultados, Matos *et al.* (2017) estudaram cultivos da *N. gaditana* em regime autotrófico, mixotrófico e heterotrófico (estes dois últimos com adição de 2 g L<sup>-1</sup> de glicose), variando o



fotoperíodo dos cultivos autotróficos e mixotrófico. Nesta publicação, a maior produtividade de óleo (Po) foi obtida no cultivo autotrófico com fotoperíodo de 16 h claro e 8 h escuro ( $15,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ). Neste caso, a adição da glicose, como fonte orgânica de carbono, não apresentou significativa melhora na Po, como foi observado para o acetato de sódio, utilizado no presente trabalho.

Embora não seja mencionado no Quadro 1, por não ter resultados de Po, o estudo realizado por Onay (2018) também apresentou resultados interessantes. Neste trabalho foi estudado o cultivo da microalga *N. gaditana* em uma mistura de meio modificado Guillard f/2, suplementado com  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato, e efluente urbano, para posterior fermentação dos açúcares produzidos e geração de etanol. Foram testadas várias proporções de meio artificial e resíduo urbano, sendo o melhor resultado de Po,  $188,93 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , obtido com uso de 30% de resíduo (ONAY, 2018). Vale ressaltar que esse resultado foi muito semelhante ao obtido no presente trabalho. A desvantagem do uso de meios artificiais é o gasto com nutrientes, mas é a única forma de se obter produtos para aplicações mais refinadas, como é o caso da indústria farmacêutica e alimentícia.

Com relação à microalga *D. salina*, percebe-se que grande parte dos artigos não menciona as produtividades de lipídeos e/ou biomassa, devido ao enfoque principal do trabalho não ter sido esse. Por outro lado, aqueles que apresentam estes dados, demonstram elevadas Po e Pb.

Morowvat, Ghasemi (2016), não mencionam Po, porém, usando meio de cultivo Johnson obtiveram produtividade de biomassa semelhante a que foi obtida neste trabalho ( $180 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ). Nesse mesmo trabalho foi obtida uma Pb de  $460 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , porém utilizando altas concentrações de nutrientes (MOROWVAT; GHASEMI, 2016).

Liu (2016), por sua vez, obteve altas Po com duas linhagens da microalga *D. salina*, porém usando suplementos de fertilizante e ureia. Sendo assim, convém sugerir para futuros trabalhos o emprego de fontes alternativas de nutrientes. Especialmente fontes orgânicas de nitrogênio, que podem influenciar positivamente o cultivo das microalgas (LIU, 2016). A presença de uma segunda etapa de cultivo, com a adição de mais nutrientes, também pode ser uma boa opção para trabalhos futuros (CHEN *et al.*, 2015b).

Outro trabalho relacionado à microalga *D. salina*, que apesar de não ser mencionado no Quadro 1 (devido à ausência de dados de Po), também merece destaque é o de Zhu *et al.* (2018). Neste trabalho foi avaliado o uso de água de resíduo de plantas de dessalinização para o cultivo das microalgas, bem como a influência do bicarbonato na produção de biomassa e  $\beta$ -caroteno. O resultado mais elevado obtido pelos autores, em pequena escala, foi de  $111 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Embora este valor seja semelhante ao melhor resultado obtido para a *D. salina*, na segunda

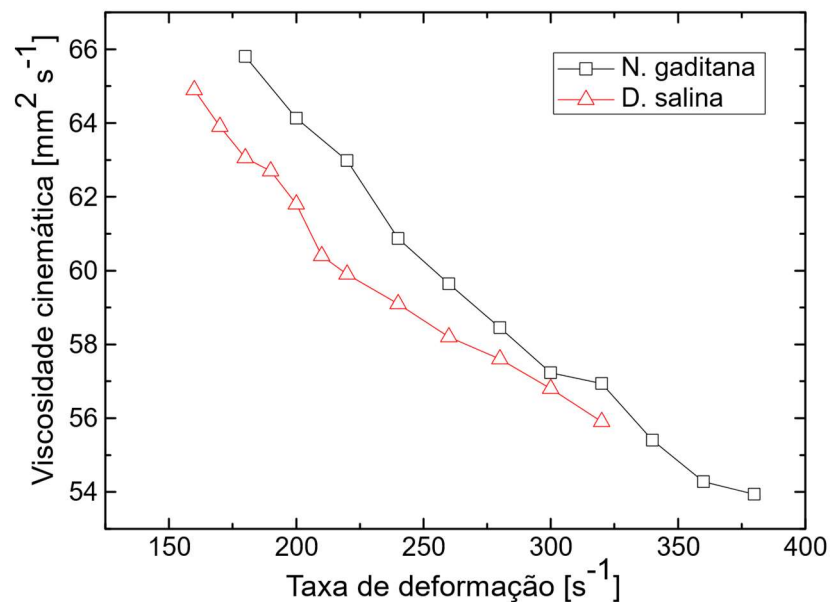
etapa, ( $118,56 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), foi obtido usando valores mais elevados de concentração de nitrato e bicarbonato por parte dos autores ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  e  $8,4 \text{ g L}^{-1}$  de acetato) (ZHU *et al.*, 2018).

#### 4.2.3.1 Índice de iodo, viscosidade, teor de ácidos graxos livres e índice de acidez

Os óleos microbianos foram caracterizados quanto à viscosidade, teor de ácidos graxos livres, índice de acidez e índice de iodo. A Figura 30 representa o gráfico obtido a partir das análises de viscosidade dos óleos das microalgas *N. gaditana* e *D. salina*.

Conforme nota-se pela Figura 30, os óleos obtidos, a partir de ambas as linhagens estudadas, apresentaram grande variação de viscosidade em função da taxa de deformação. Esta propriedade é muito comum nos óleos microbianos, em especial de microalgas e cianobactérias, o que caracteriza estes fluidos como não newtonianos (DA RÓS *et al.*, 2013; LOURES *et al.*, 2018). Os valores médios de viscosidade cinemática, bem como os demais dados de caracterização dos óleos das microalgas estudadas estão apresentados na Tabela 19.

Figura 30: Gráfico da análise de viscosidade do óleo obtido nas melhores condições previstas pelo planejamento de experimentos.



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 19: Propriedades físico-químicas dos óleos obtidos nas melhores condições de cultivo de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

| Microalga   | <i>N. gaditana</i> | <i>Dunaliella salina</i> |
|---|--------------------|--------------------------|
| Viscosidade cinemática [mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ] | 58,40 ± 0,50       | 60,1 ± 0,40              |
| Ácidos graxos livres [%]                                  | 18,40 ± 1,20       | 23,26 ± 1,30             |
| Índice de acidez [mg KOH g <sup>-1</sup> ]                | 36,62 ± 0,90       | 46,27 ± 1,70             |
| Índice de iodo [g I <sub>2</sub> 100g <sup>-1</sup> ]     | 78,00 ± 0,70       | 46,00 ± 0,30             |

Fonte: Produção do próprio autor

Pela análise da tabela 17, nota-se que os valores de viscosidade do óleo das microalgas estudadas foram semelhantes entre si. Resultados similares também foram obtidos por Loures *et al.*, (2018), para o óleo extraído da microalga *Chlorella minutissima* (61,2 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> à 50°C) e para alguns óleos de cianobactérias medidos à 50°C: *M. aeruginosa* – 52,7 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; *Trichormus* sp. – 59,1 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; *Synechococcus* sp. – 62,3 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (DA RÓS *et al.*, 2013). Os valores de viscosidade para os óleos microbianos são mais elevados em comparação aos óleos vegetais: andiroba – 38,7 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; babaçu – 29,5 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; macaúba – 29,8 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; palma – 36,8 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>; mamona 34,5 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (CARVALHO *et al.*, 2013).

O índice de acidez (IA, Tabela 19) foi maior para o óleo da microalga *D. salina*, significando que seu óleo tem maior teor de ácidos graxos livres. Esses resultados foram superiores aos reportados por Loures *et al.* (2018), 26,1 mg KOH g<sup>-1</sup>, para o óleo da microalga *Chlorella minutissima*. Entretanto, os valores obtidos em ambos os estudos foram mais elevados em relação aos obtidos para alguns óleos vegetais (mg [KOH g<sup>-1</sup>]): andiroba – 0,1; babaçu – 0,7; palma – 0,3; mamona – 0,3; zapota – 3,79; jupati – 10,0 (CARVALHO *et al.*, 2013; KUMAR; SURESHKUMAR; VELRAJ, 2015). Uma característica já esperada para os óleos de origem microbiana. Apesar dos resultados de IA obtidos no presente trabalho serem considerados altos para a maioria dos óleos vegetais, eles estão entre os mais baixos em relação aos óleos residuais (entre 1,3 a 193 mg KOH g<sup>-1</sup>) (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015).

Uma última informação relevante que consta na Tabela 19 é o índice de iodo (Ii), que resultou em valores distintos para os óleos das linhagens estudadas. O Ii mede o grau de instauração de um óleo. Quanto maior o Ii, maior o grau de instauração do óleo. Com isto, percebe-se que o óleo obtido a partir da microalga *N. gaditana* apresentou mais insaturações em relação ao óleo da *D. salina*. Loures *et al.* (2018), por exemplo, obtiveram 30 gI<sub>2</sub> 100g<sup>-1</sup>, quando avaliaram o óleo da microalga *Chlorella minutissima*. Esse óleo apresentou menos

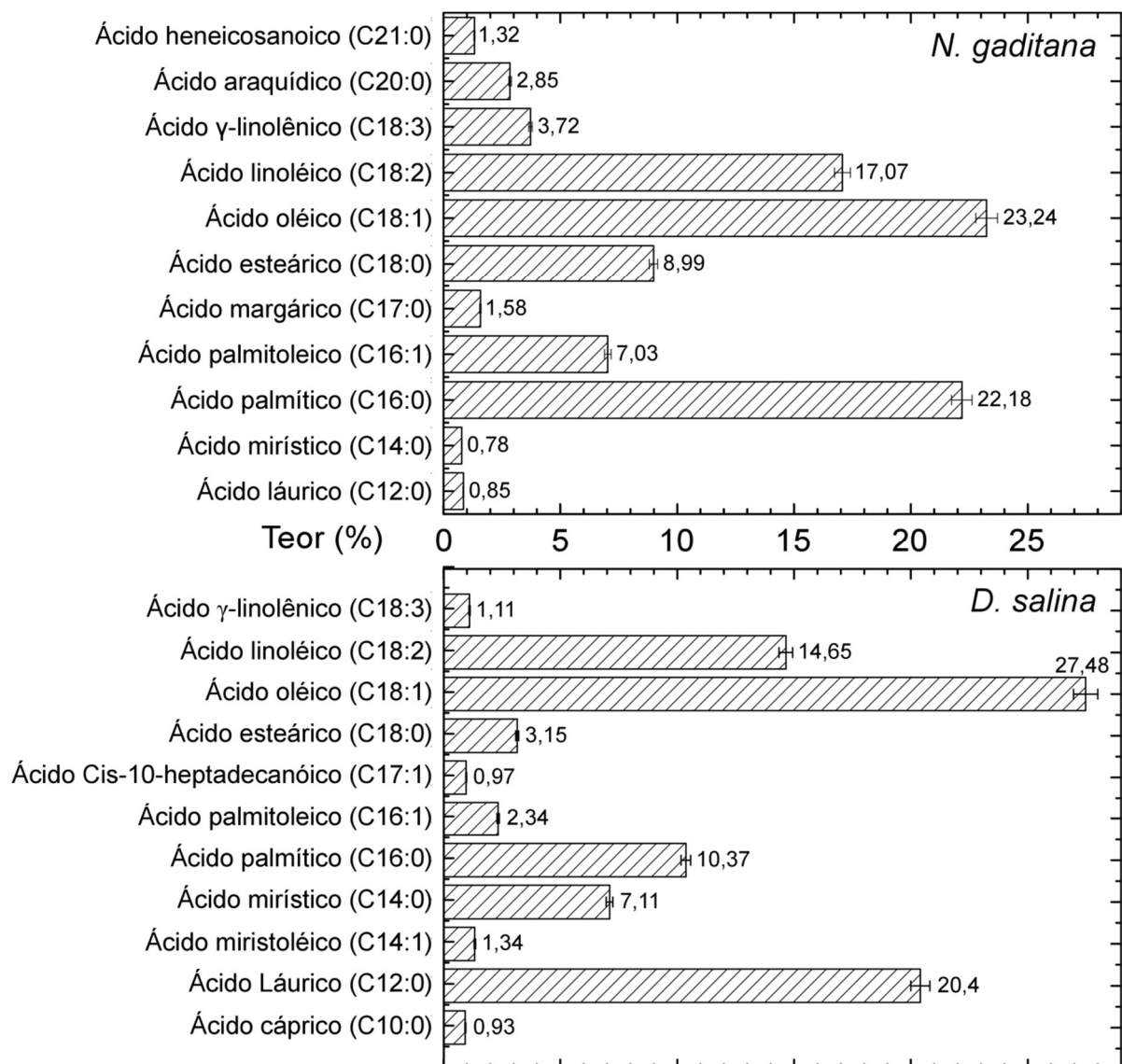
insaturações em relação ao óleo obtido no presente trabalho, para ambas as espécies estudadas. Os valores de I<sub>i</sub> [gI<sub>2</sub> 100g<sup>-1</sup>] obtidos de alguns óleos vegetais foram maiores que os resultados aqui obtidos (palma – 98; mamona – 101), menores (babaçu – 25; macaúba – 28) ou intermediários entre os valores das microalgas estudadas (andiroba – 69; zapota – 65) (CARVALHO *et al.*, 2013; KUMAR; SURESHKUMAR; VELRAJ, 2015).

Os resultados de I<sub>i</sub> são de grande importância para o estudo do grau de instauração de um óleo. Entretanto, torna-se necessário uma análise mais refinada, como o perfil dos ácidos graxos (AGs), obtido por cromatografia gasosa (CG). A Figura 31 ilustra os perfis de AG obtidos nas melhores condições de cultivo, de acordo com os resultados na segunda etapa.

O Quadro 2 e o Quadro 3, por sua vez, mostram dados reportados pela literatura, com relação aos AGs majoritariamente presentes no óleo das microalgas *N. gaditana* e *D. salina*, respectivamente. Os resultados apresentam a faixa de teores (máximo e mínimo) obtidos para cada AG em cada referência consultada.

Pela análise do Quadro 2, percebe-se que, em alguns trabalhos (CANCELA *et al.*, 2019; CARRERO *et al.*, 2015; JAZZAR *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2015; MILLAO; UQUICHE, 2016; PEÑA *et al.*, 2015) não é mencionado de forma detalhada o modo de cultivo, nem os nutrientes empregados na obtenção da biomassa. Isto ocorre, pois o objetivo dos respectivos trabalhos foi focado no estudo do óleo microbiano (CARRERO *et al.*, 2015; JAZZAR *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2015) ou na produção de biodiesel (CANCELA *et al.*, 2019; PEÑA *et al.*, 2015). Em alguns casos a biomassa foi adquirida de terceiros.

Figura 31: Perfil de AGs resultante do óleo microalgal obtido das melhores condições de cultivo das microalgas *N. gaditana* (+,+) e *D. salina* (0,0)<sup>45</sup>



Fonte: Produção do próprio autor

<sup>4</sup> Teores dos ácidos graxos em %m/m.

<sup>5</sup> São mostrados apenas os AGs identificados com teores superiores a 0,7%

Quadro 2: Teor dos principais AGs obtidos da literatura com relação a microalga *N. gaditana*.

(continua)

| Referências                    | Meio  | Teor de ácido graxo (%) |            |            |       |        |        |        |        |
|--------------------------------|---|-------------------------|------------|------------|-------|--------|--------|--------|--------|
|                                |   | C14:0                   | C16:0      | C16:1      | C18:0 | C18:1  | C18:2  | C18:3  | C20:5  |
| (CARRERO <i>et al.</i> , 2015) | Biomassa adquirida de terceiros   | 4,4                     | 24,6       | 32,4       | 0,8   | 3,9    | 2,3    | 2,1    | 16,9   |
| (JAZZAR <i>et al.</i> , 2015)  | Biomassa adquirida de terceiros   | 6,8                     | 19,4       | 32,1       | -     | 5,8    | 5,5    | -      | 21,0   |
| (LÓPEZ <i>et al.</i> , 2015)   | Biomassa adquirida de terceiros   | 7,3                     | 23,3       | 24,8       | -     | 3,9    | 3,8    | -      | 29,8   |
| (MATOS <i>et al.</i> , 2015)   | Mistura de Guillard f/2 (75 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> ) e resíduo de planta de dessalinização (30 mg L <sup>-1</sup> de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).<br>Foram testadas as fontes de carbono: glicose, glicerol e glicerina | 1,3a                    | 29,4a      | 1,7a       | 0,5a  | 4,8a   | 0,5a   | 0,4 a  | 12,2a  |
|                                |   | 12,2                    | 56,8       | 30,7       | 17,3  | 25,0   | 5,5    | 5,1    | 0,2    |
| (PEÑA <i>et al.</i> , 2015)    | Não mencionado  | 3,0                     | 16,0       | 17,1       | -     | 0,5    | 8,0    | 9,0    | 20,5   |
| (MITRA <i>et al.</i> , 2015)   | Meio Conway (100 mg L <sup>-1</sup> de KNO <sub>3</sub> )   | 4,15 a                  | 17,65      | 19,52      | -     | 0,29 a | 6,03 a | 1,32 a | 19,3 a |
|                                |   | 6,83                    | a<br>29,51 | a<br>35,59 |       | 5,41   | 11,74  | 3,62   | 37,83  |
| (PEDRO <i>et al.</i> , 2015)   | Água marinha suplementada com fertilizantes (10,5mM NO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , equivale a 892,5mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> )   | 2,6 a                   | 13,5 a     | 9,3 a      | -     | 1,9 a  | 1,9 a  | -      | 10,8 a |
|                                |   | 8,9                     | 22,7       | 34,8       |       | 9,4    | 8,2    |        | 33,9   |

Quadro 2: Teor dos principais AGs obtidos da literatura com relação a microalga *N. gaditana*.

(conclusão)

| Referências                        | Meio  | Teor de ácido graxo (%) |                 |                 |               |                |               |               |                |
|------------------------------------|---|-------------------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|
|                                    |   | C14:0                   | C16:0           | C16:1           | C18:0         | C18:1          | C18:2         | C18:3         | C20:5          |
| (MILLAO; UQUICHE, 2016)            | Biomassa adquirida de terceiros   | 10,61                   | 30,03           | 28,13           | -             | 11,49          | 2,33          | -             | 8,06           |
| (PEDRO <i>et al.</i> , 2016)       | Água marinha suplementada com fertilizantes (10 mM NO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , equivalente a 850 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> )  | 3,1 a<br>7,6            | 13,9 a<br>28,1  | 4,0 a<br>29,7   | -             | 2,5 a<br>10,4  | 2,4 a<br>19,1 | -             | 2,5 a<br>37,2  |
| (MATOS <i>et al.</i> , 2017)       | Mistura de Guillard f/2 (75 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> ) e resíduo de planta de dessalinização (30 mg L <sup>-1</sup> de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). Foi testado uso de glicose. | 0,8 a<br>12,0           | 25,1 a<br>54,5  | -               | -             | 2,2 a<br>12,3  | 3,7 a<br>26,6 | 0,5 a<br>13,8 | 0,1 a<br>5,6   |
| (EL ARROUSSI <i>et al.</i> , 2017) | Água marinha enriquecida com os nutrientes do meio Guillard f/2   | 2,46 a<br>5,41          | 16,01a<br>27,81 | 15,98a<br>26,79 | 0 a<br>4,8    | 0 a<br>19,48   | 0             | 0 a<br>36,2   | -              |
| (CANCELA <i>et al.</i> , 2019)     | Água marinha filtrada e Goldmedium  | 6,83                    | 45,8            | 18,30           | 17,07         | 4,48           | 1,19          | -             | 6,33           |
| (FERREIRA <i>et al.</i> , 2018)    | Água do mar suplementada com nutrientes (KNO <sub>3</sub> 4mM)  | 6,71-<br>8,55           | 24,22-<br>34,22 | 22,84-<br>28,22 | 1,11-<br>1,59 | 4,83-<br>12,27 | 0,93-<br>2,80 | -             | 9,79-<br>27,62 |

Fonte: Produção do próprio autor

Quadro 3: Teor dos principais AGs obtidos da literatura com relação a microalga *D. salina*.

| Referências                        | Meio   | Teor de ácido graxo (%) |           |           |           |           |          |
|------------------------------------|--|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
|                                    |  | C16:0 (%)               | C16:1 (%) | C18:0 (%) | C18:1 (%) | C18:2 (%) | C18:3(%) |
| (CHO <i>et al.</i> , 2015)         | Meio Erd-Schreiber's modificado (120 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> ). Foi testado o uso de mio-inositol como nutriente suplementar ao meio | 23,62                   | 0,35      | 4,38      | 4,53      | 18,64     | 43,78    |
|                                    |  | a                       | a         | a         | a         | a         | a        |
|                                    |  | 25,61                   | 0,39      | 5,15      | 5,78      | 20,18     | 46,37    |
| (CHEN <i>et al.</i> , 2015b)       | Meio Guillard f/2  | 18,5                    | -         | 10,4      | 11,1      | -         | 18,6     |
| (CHO <i>et al.</i> , 2016a)        | Meio Erd-Schreiber's modificado (120 mg L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub> )   | 18,65                   | 0,00      | 1,75      | 1,23      | 8,95      | 23,64    |
|                                    |  | a                       | a         | a         | a         | a         | a        |
|                                    |  | 30,81                   | 0,25      | 9,76      | 3,39      | 26,39     | 50,97    |
| (CHO <i>et al.</i> , 2016b)        | Meio Guillard f/2. Foi testado o uso de fenol como indutor de stress oxidativo.  | 11,00                   | 0,22      | 0,02      | 1,57      | 24,84     | 50,03    |
|                                    |  | a                       | a         | a         | a         | a         | a        |
|                                    |  | 19,63                   | 0,32      | 1,83      | 2,36      | 28,66     | 57,87    |
| (EL ARROUSSI <i>et al.</i> , 2017) | Água marinha enriquecida com os nutrientes do meio Guillard f/2  | 20,84                   | 0         | -         | -         | -         | 41,56    |
|                                    |  | a                       | a         | -         | -         | -         | a        |
|                                    |  | 26,2                    | 4,2       | -         | -         | -         | 64,61    |

Fonte: Produção do próprio autor



Alguns trabalhos mostram que, mesmo quando a biomassa da *N. gaditana* foi adquirida de fontes distintas, os perfis de AGs foram semelhantes, com baixos teores de AGs com 18 carbonos: aproximadamente 20% de C20:5, 20% de C16:0 e 30% de C16:1. Esses resultados diferem um pouco em relação aos valores obtidos no presente trabalho. Especialmente, apresentando menores teores de AGs de 18 carbonos e maiores teores de C16:1 e C20:5 (CARRERO *et al.*, 2015; JAZZAR *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2015; PEÑA *et al.*, 2015). Peña *et al.* (2015), por outro lado, obteve maior teor de C18:3 (9%) e menor de C16:1 (17,1%), em relação aos demais trabalhos. Valores estes maiores que o obtido no presente estudo (3,72% de C18:3 e 7,03% de C16:1).

Millao e Uquiche (2016) se destacaram pela obtenção de um elevado teor de C18:1, 11,49%, em relação à literatura consultada. Menor teor, no entanto, em comparação com o presente estudo. Cancela *et al.* (2019) obtiveram o maior teor de ácido esteárico (C18:0), em comparação com os demais trabalhos da literatura consultada e com o resultado obtido nesse estudo (8,99%). Porém obtiveram menores resultados de C18:1 e C18:2 (4,48 e 1,13%, respectivamente), em relação ao presente trabalho.

Matos *et al.* (2015), por sua vez, cultivou a microalga *N. gaditana*, utilizando o meio Guillard f/2 misturado à um resíduo de planta de dessalinização. Neste trabalho foram testadas algumas fontes de carbono (glicose, glicerol e glicerina). Dos resultados apresentados pelos autores, a glicerina, aparentemente, inibiu a formação de C16:1, pois seu teor não passou de 2% quando esta fonte de carbono foi empregada, enquanto os demais cultivos apresentaram teores entre 10,9 e 30,7%. É possível que o acetato tenha efeito semelhante sobre o C16:1, visto que no presente trabalho obteve-se apenas 7,03% deste AG.

Segundo Matos *et al.* (2015), os teores dos AGs C18:0 e C18:1 foram mais elevados quando glicose foi empregada no meio de cultivo, enquanto que os AGs C18:2 e C18:3 não foram influenciados pela fonte de carbono. O AG C20:5, por sua vez, revelou seu maior valor em meio f/2, sem fonte de carbono adicional, (12,2%) (MATOS *et al.*, 2015). Percebe-se com estes resultados, que a fonte de carbono tem forte influência sobre o perfil dos AGs do óleo produzido pelas microalgas.

Em uma continuação de estudo, Matos *et al.* (2017) trabalhou com o mesmo resíduo de planta de dessalinização misturado ao meio Guillard f/2, para o cultivo da microalga *N. gaditana*. Os autores testaram cultivos nos regimes autotrófico, mixotrófico e heterotrófico. Nos cultivos autotrófico e mixotrófico foi avaliado o efeito do fotoperíodo. Enquanto isto, nos cultivos heterotrófico e mixotrófico foi utilizado glicose (2 g L<sup>-1</sup>) (MATOS *et al.*, 2017). Nos resultados apresentados pelos autores, percebe-se que a presença de glicose, cultivo

mixotrófico, desfavoreceu a produção de C16:0. Quando os autores utilizaram, por exemplo, um fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro em presença de glicose, cultivo mixotrófico, o teor de C16:0 foi de 25,1%. Entretanto, a concentração de C16:0 passou para 54,5% quando não foi utilizado glicose, para o mesmo fotoperíodo, cultivo autotrófico (MATOS *et al.*, 2017). O cultivo heterotrófico (com 2 g L<sup>-1</sup> de glicose no escuro), por sua vez, favoreceu a produção dos ácidos graxos C18:1, C18:2, C18:3 e C20:5, obtendo 12,2; 26,6; 13,8 e 5,6%, respectivamente (MATOS *et al.*, 2017).

Mitra *et al.* (2015) estudaram salinidade, intensidade de luz e fotoperíodo sobre o cultivo da *N. gaditana*. Os autores observaram pouca variação do AG C16:0 em função destes fatores, com resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. O teor de C16:1 obtido pelos autores variou significativamente, sendo favorecido por maior intensidade de luz e maior salinidade. Os teores dos AGs de 18 carbonos obtidos por Mitra *et al.* (2015) foram menores em relação aos obtidos nesse trabalho, reforçando a ideia de que o uso de acetato, não empregado pelos autores, favoreça a produção de tais AGs.

Pedro *et al.* (2015), ao contrário do efetuado no presente trabalho, utilizou luz solar na iluminação de seus cultivos, estudando a influência da época do ano, em uma “*raceway pond*” que operava em regime batelada e contínuo. Pelos dados apresentados pelos autores, o teor de nitrato teve pouca influência sobre o perfil de ácidos graxos. Quando empregado de 0,8 a 5,5 mM de nitrato, o teor de C20:5 variou entre 21,5 e 25,6%. Quando foram usados 9,2 ou 10,5 mM, os valores obtidos foram 30,1 e 28,7%, respectivamente. Ou seja, para mudanças mais significativas no perfil de ácidos graxos, a concentração de nitrato empregada no cultivo deveria ser muito mais elevada. Pedro *et al.* (2016), em uma continuação de estudo, obtiveram resultados semelhantes quanto ao perfil de ácidos graxos em relação ao primeiro trabalho.

El Arroussi *et al.* (2017), por sua vez, fizeram uma análise de varredura abrangendo 57 linhagens de microalgas, obtidas da costa do Marrocos, tanto do Oceano Atlântico, quanto do Mar Mediterrâneo. Dentre estas linhagens foram estudadas duas da microalga *N. gaditana* (Quadro 2), e duas da microalga *D. salina*, (Quadro 3). Todos os cultivos realizados pelos autores utilizaram água marinha enriquecida com os nutrientes do meio Guillard f/2. Com relação aos AGs com 18 carbonos, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram maiores teores dos AGs C18:1 e C18:2. Enquanto isto, os resultados de El Arroussi *et al.* (2017) são mais voltados para o AG C18:3. Sabe-se que ambos os trabalhos têm como base o meio de cultivo Guillard f/2, e que o presente trabalho empregou grande quantidade de acetato de sódio, nutriente não utilizado por El Arroussi *et al.* (2017). Portanto, é provável que esta fonte de carbono, além de aumentar a produção de óleo da *N. gaditana*, tem forte influência em seu

perfil de AGs. Outro fator que diferencia substancialmente os resultados do presente trabalho com os das duas linhagens estudadas por El Arroussi *et al.* (2017), é o baixo teor de C16:1 aqui reportado.

Ainda com relação à microalga *N. gaditana*, o presente trabalho obteve quantidade significativa do AG C20:0, 2,85%, embora as referências do Quadro 2 não o mencionem. Abedini Najafabadi *et al.* (2015), por outro lado, quando trabalhou com a microalga *Chlorella vulgaris*, obteve resultados entre 1,1 e 2,0% de C20:0, semelhantes ao resultado aqui obtido (2,85%).

A partir desse ponto serão analisados os dados reportados no Quadro 3, sobre o perfil de AGs da microalga *D. salina*.

(CHEN *et al.*, 2015b), trabalhou com cultivos em duas etapas, sendo que na primeira foi utilizado meio Guillard f/2, enquanto na segunda trabalhou com o meio Guillard f/2 completo ou sem algum dos nutrientes (nitrato, fosfato, vitaminas ou metais traço). Considerando os resultados apresentados pelos autores, percebe-se que o maior teor de C18:3 foi obtido quando a segunda etapa não continha os elementos traço (18,6%, maior que o resultado obtido no presente trabalho, 1,11%). Nesta mesma condição, o teor de C18:1 foi de 11,1% (valor menor em relação ao aqui obtido, 27,48%). Por estes resultados, percebe-se que o acetato, aqui empregado, pode alterar o perfil de AGs, desfavorecendo a produção de C18:3.

No trabalho de Cho *et al.* (2015), foi testado o uso de mio-inositol ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) como suplemento ao cultivo da microalga *D. salina*. Os autores apresentaram duas análises de CG do perfil de AGs do óleo microalgal: um obtido do cultivo com mio-inositol; outro do meio “controle”, sem mio-inositol. Este nutriente aparentou não influenciar na produção do AG C16:0, nem do C16:1. No entanto, Cho *et al.* (2015) obtiveram maiores teores de C16:0 e menores teores de C16:1, em relação aos resultados aqui obtidos. O mio-inositol também não demonstrou grande influência sobre os teores dos AGs com 18 átomos de carbono na cadeia (CHO *et al.*, 2015). Comparando-se com o presente trabalho, os valores de C18:0 e C18:2 foram razoavelmente semelhantes. Contudo, enquanto que o presente trabalho apresentou elevados valores de C18:1, Cho *et al.* (2015) apresentou altos teores de C18:3. Embora o mio-inositol não tenha alterado fortemente os dados de Cho *et al.* (2015), o acetato de sódio pode ter sido um motivador do direcionamento da produção da *D. salina* do AG C18:3 para o C18:1.

Cho *et al.* (2016a) testou o uso de *Heterocapsa circularisquama* para a biofloculação da microalga *D. salina*. Foram feitas duas análises de CG, uma com óleo de uma biomassa que foi colhida por centrifugação e a outra de um óleo da biomassa que foi colhida por biofloculação, usando *Heterocapsa circularisquama*. Pelos resultados publicados por Cho *et al.* (2016a),

percebe-se que o uso deste tipo de biofloculação afetou grandemente os resultados do perfil dos ácidos graxos, especialmente com relação aos AGs C16:0, C18:2 e C18:3. Verifica-se que a biofloculação reduz o teor dos ácidos graxos poli-insaturados (C18:2 e C18:3) do óleo resultante, aumentando o teor dos AGs saturados, como o C16:0 (CHO et al., 2016a). Em outras palavras, este processo de colheita pode ser vantajoso na obtenção de óleo para a produção de biodiesel.

Cho *et al.* (2016b), por sua vez, trabalhou com a influência da toxicidade do fenol como estresse oxidativo sobre a microalga *D. salina*. Neste caso, a concentração de fenol no meio foi variada de 0 a 150 mg L<sup>-1</sup> e foi estudado, dentre outras coisas, o efeito deste sobre o perfil de ácidos graxos do óleo obtido. Percebe-se, pelo Quadro 3, que o fenol teve pouca influência sobre os AGs C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2, contudo influenciou substancialmente os teores dos AGs C16:0 e C18:3. Os valores de C16:0 obtidos por Cho *et al.* (2016b) tendem a reduzir com o aumento da concentração de fenol, sendo seu menor valor (11%), obtido com 150 mg L<sup>-1</sup> de fenol, o mais semelhante com o aqui reportado (10,37%). Com relação ao AG C18:3, houve um substancial aumento em seu teor no óleo com o aumento no teor de fenol.

Da mesma forma que trabalhou com duas linhagens da microalga *N. gaditana*, El Arroussi *et al.* (2017) também trabalhou com duas linhagens da *D. salina*, conforme mostra o Quadro 3. Por estes resultados percebe-se grande diferença com relação ao perfil dos AGs com 18 carbonos na cadeia. O presente trabalho revelou teores substancialmente maiores dos AGs C18:1 e C18:2, enquanto que El Arroussi *et al.* (2017) reportaram elevados teores do C18:3, de modo semelhante ao ocorrido com a *N. gaditana*. Esses resultados mostram mais evidências de que o acetato de sódio desloca o metabolismo celular das microalgas estudadas, alterando seu perfil de AGs.

#### 4.3. ETAPA III: ESTUDO DE DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA ( $\lambda$ ) COMO FONTE DE ILUMINAÇÃO NO CULTIVO DAS MICROALGAS

A terceira etapa do presente trabalho visou estudar o efeito do  $\lambda$ , na iluminação empregada durante o cultivo, sobre a produtividade da microalga *Dunaliella salina* (Pb e Po) e sobre o perfil de AGs do óleo obtido.

Para esta finalidade, foram empregados dois planejamentos de mistura simplex com centroide. Em ambos os casos, foi utilizado o meio Guillard f/2 com 150 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, melhor ajuste encontrado na etapa anterior.

A distinção entre os planejamentos foi o fato de um ser executado com acetato ( $4\text{g L}^{-1}$ , seguindo o melhor ajuste da etapa 2), enquanto o segundo planejamento foi feito sem a adição desta fonte de carbono. Com esta análise pode-se perceber não somente o comportamento da produtividade do cultivo (Pb e Po) quando se varia o  $\lambda$ , mas também como este comportamento varia em função da presença ou ausência de uma fonte orgânica de carbono. Os resultados de Pb e Po estão sumarizados na Tabela 20 e na Figura 32.

Tabela 20: Resultados de Pb e Po da *D. salina* do planejamento de mistura simplex

|   | Variáveis de entrada <sup>6</sup> |       |       | Sem acetato                                   |   | Com acetato                                   |   |
|---|-----------------------------------|-------|-------|---|---|---|---|
|   | Azul                              | Verm. | Verde | Pb<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | Po<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | Pb<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] | Po<br>[mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ] |
| 1 | 1                                 | 0     | 0     | 11,43±0,14                                    | 0,81±0,01                                     | 81,17±1,20                                    | 24,03±3,11                                    |
| 2 | 0                                 | 1     | 0     | 13,35±0,24                                    | 1,18±0,02                                     | 88,80±12,86                                   | 2,60±0,25                                     |
| 3 | 0                                 | 0     | 1     | 11,46±0,29                                    | 1,31±0,03                                     | 103,87±8,87                                   | 4,34±1,73                                     |
| 4 | ½                                 | ½     | 0     | 21,19±0,18                                    | 1,96±0,02                                     | 89,88±10,41                                   | 38,26±8,95                                    |
| 5 | ½                                 | 0     | ½     | 7,99±0,01                                     | 1,05±0,001                                    | 91,24±18,12                                   | 45,33±12,03                                   |
| 6 | 0                                 | ½     | ½     | 14,93±0,27                                    | 1,09±0,02                                     | 89,99±8,52                                    | 42,47±10,12                                   |
| 7 | ⅓                                 | ⅓     | ⅓     | 9,59±0,02                                     | 0,63±0,001                                    | 136,67±8,20                                   | 24,69±0,50                                    |

Fonte: Produção do próprio autor

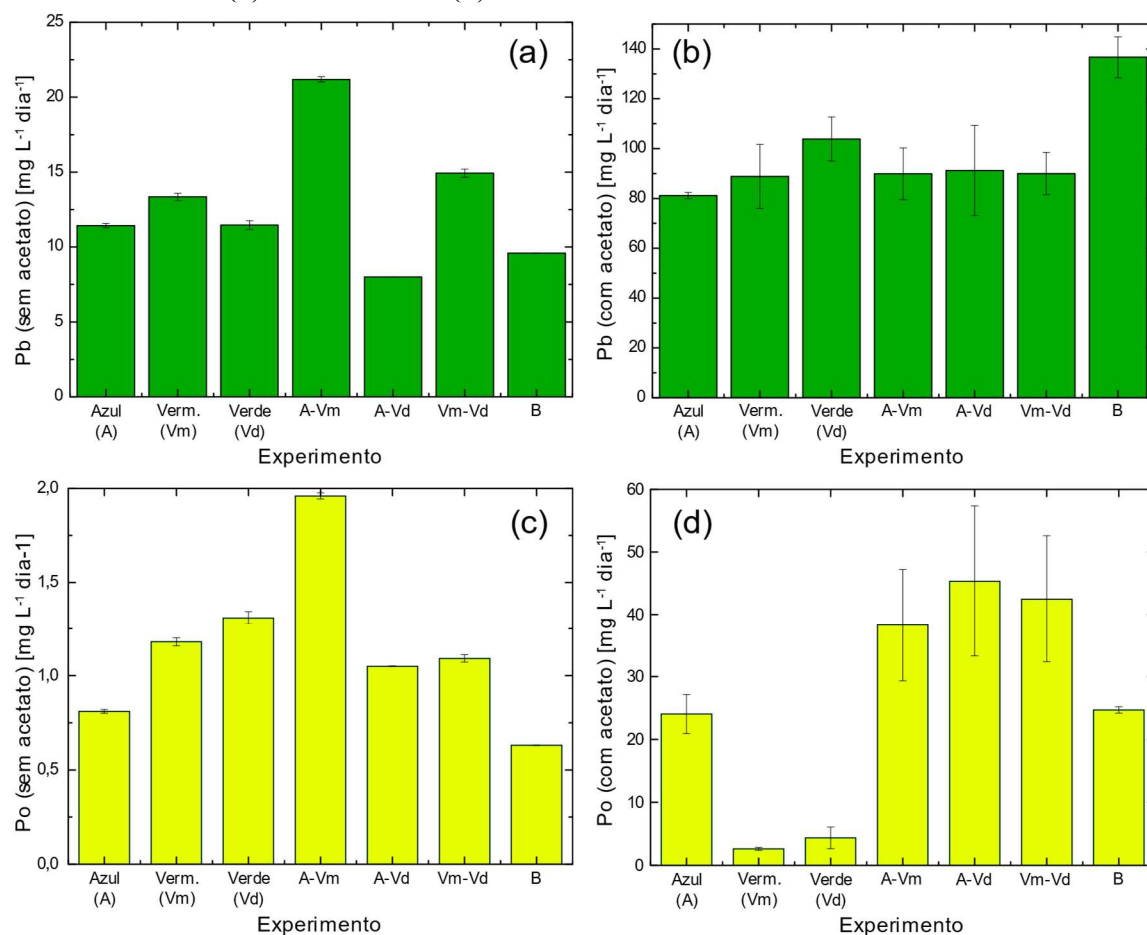
Com relação aos resultados de biomassa, percebe-se que os cultivos realizados com acetato apresentaram resultados semelhantes entre si, sendo que o experimento realizado em luz branca forneceu o maior valor de produtividade,  $\text{Pb}=136,67 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , conforme mostra a Figura 32 (b). Enquanto que, para o cultivo realizado na ausência desse nutriente observou-se uma influência maior do  $\lambda$  sobre a Pb, com melhor resultado sob iluminação azul e vermelha,  $\text{Pb}=21,19 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , vide Figura 32 (a). Provavelmente, a adição de uma fonte orgânica de carbono (acetato), que não precisa da fotossíntese para absorção, resulta em uma menor influência da iluminação sobre a Pb.

A produtividade de lipídeos (Po), por outro lado, foi fortemente influenciada pelo  $\lambda$  empregado no cultivo, tanto na presença quanto na ausência de acetato, conforme mostra a Tabela 20 e a Figura 32. Os melhores resultados obtidos foram de  $45,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (luz azul

<sup>6</sup> Neste caso, as Ve representam as proporções de LEDs de cada cor utilizadas em cada condição (e.g. o experimento 7 teve a iluminação composta de ⅓ de cada uma das três cores, sendo iluminado por luz branca).

e verde) e  $1,96 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  (luz azul e vermelha), na presença e ausência de acetato, respectivamente. Além disso, o acetato de sódio resultou em um aumento significativo de Pb, Po e teor de lipídeos, demonstrando sua grande importância para o cultivo.

Figura 32: Resultados da terceira etapa da *D. salina*, com relação à Pb: (a) sem acetato e (b) com acetato e Po: (c) sem acetato e (d) com acetato.



Fonte: Produção do próprio autor

Os valores obtidos de acordo com a matriz experimental foram analisados usando softwares estatísticos, sendo que foi empregado o logaritmo natural dos valores de Po,  $\ln(\text{Po})$ , ao invés dos valores originais, devido a um melhor ajuste do modelo matemático. Desta forma,  $\ln(\text{Po})$  foi utilizado como Vs nas análises estatísticas a seguir.

Tabela 21: Análise de ANOVA do planejamento de mistura simplex da *D. salina* sem acetato no meio de cultivo

| Efeito         | Gl | SQ    | SQ<br>ajustados | QM<br>ajustados | F       | p (%) |
|----------------|----|-------|-----------------|-----------------|---------|-------|
| Regressão      | 6  | 1,55  | 1,55            | 0,26            | 579,81  | ≈0    |
| Linear         | 2  | 0,12  | 0,26            | 0,13            | 286,93  | ≈0    |
| Quadrática     | 3  | 0,64  | 0,73            | 0,24            | 550,34  | ≈0    |
| Azul-vermelho  | 1  | 0,32  | 0,65            | 0,65            | 1452,19 | ≈0    |
| Azul-verde     | 1  | 0,08  | 0,0005          | 0,0005          | 1,06    | 33,8  |
| Vermelho-verde | 1  | 0,24  | 0,02            | 0,02            | 50,72   | ≈0    |
| Cúbico esp.    | 1  | 0,78  | 0,78            | 0,78            | 1748,65 | ≈0    |
| A-Vm-Vd        | 1  | 0,78  | 0,78            | 0,78            | 1748,65 | ≈0    |
| Residual       | 7  | 0,003 | 0,003           | 0,0004          |         |       |
| Total          | 13 | 1,55  |                 |                 |         |       |

Fonte: MINITAB INC. (2018).

Tabela 22: Análise de ANOVA do planejamento de mistura simplex da *D. salina* com acetato no meio de cultivo

| Efeito         | Gl | SQ    | SQ<br>ajustados | QM<br>ajustados | F     | p (%) |
|----------------|----|-------|-----------------|-----------------|-------|-------|
| Regressão      | 6  | 16,40 | 16,40           | 2,73            | 24,28 | ≈0    |
| Linear         | 2  | 4,45  | 5,55            | 2,78            | 24,64 | 0,1   |
| Quadrática     | 3  | 10,41 | 11,62           | 3,87            | 34,40 | ≈0    |
| Azul-vermelho  | 1  | 1,62  | 3,23            | 3,22            | 28,68 | 0,1   |
| Azul-verde     | 1  | 1,59  | 3,01            | 3,01            | 26,69 | 0,1   |
| Vermelho-verde | 1  | 7,20  | 8,70            | 8,70            | 77,26 | ≈0    |
| Cúbico esp.    | 1  | 1,54  | 1,54            | 1,54            | 13,71 | 0,8   |
| A-Vm-Vd        | 1  | 1,54  | 1,54            | 1,54            | 13,71 | 0,8   |
| Residual       | 7  | 0,79  | 0,79            | 0,11            |       |       |
| Total          | 13 | 17,19 |                 |                 |       |       |

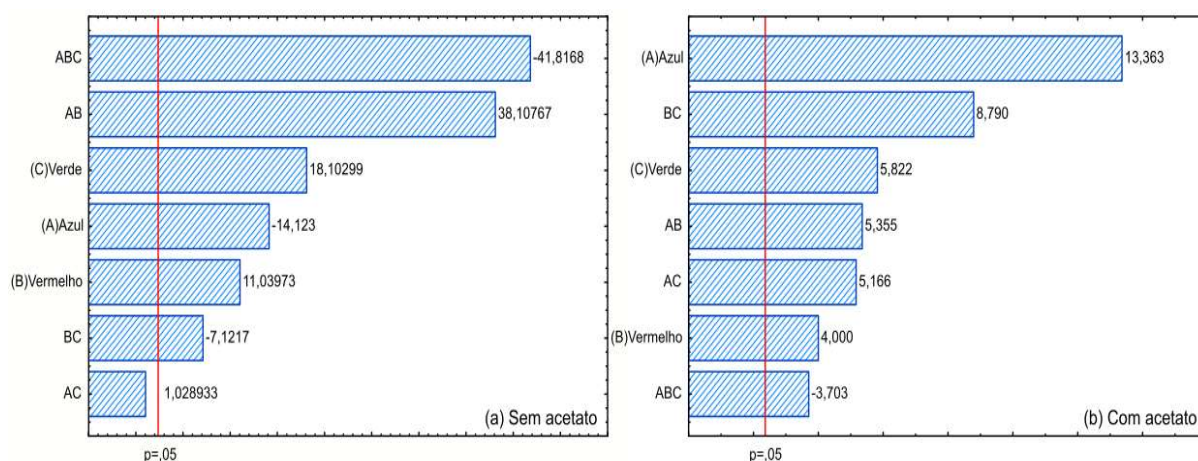
Fonte: MINITAB INC. (2018).

A partir do estudo dos resultados foram obtidos: as análise de variância (ANOVA), mostradas nas Tabela 21 e Tabela 22; os gráficos de Pareto (Figura 33). Com base nestas análises, percebe-se que todas as Vs e quase todas as interações estudadas foram relevantes

( $p < 1\%$ ). A única exceção é a interação entre a luz azul e a luz verde, que não foi significativa ( $p > 1\%$ ) para o cultivo sem acetato (Tabela 21 e Figura 33 (a)). Isto não significa que a luz azul ou a verde sejam pouco importantes para o cultivo sem acetato. Na verdade, significa que o fator  $\beta_i X_1 X_3$ , referente à dita interação, não tem papel fundamental na modelagem do problema.

Outro fator relevante é o ajuste do modelo aos dados experimentais, indicado pelo coeficiente de correlação ajustado, R-adj. As modelagens realizadas sem e com acetato geraram valores de R-adj de 0,996 e 0,9148, respectivamente. Estes valores, muito próximos de 1, indicam forte correlação entre as variáveis de entrada (Ve) e a variável de saída (Vs). Isso mostra que, ambos os modelos apresentam ótimos ajustes aos dados experimentais obtidos.

Figura 33: Gráficos de Pareto da Po da *D. salina* em cultivos: (a) sem acetato; (b) com acetato.



Fonte: STATSOFT (2018).

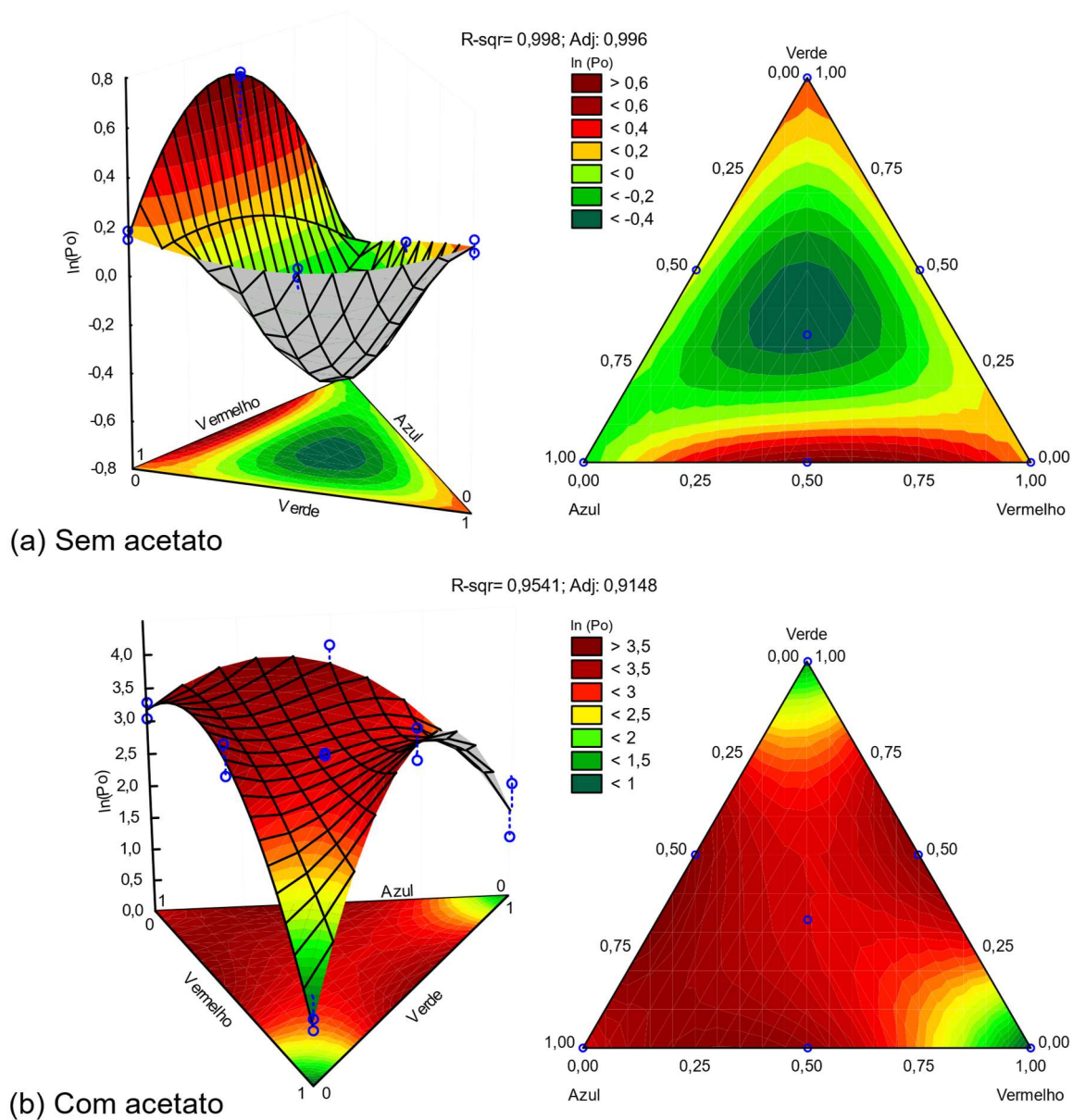
Os modelos matemáticos para os cultivos sem acetato e com acetato estão representados nas Equações 26 e 27, respectivamente. Estas funções empíricas relacionam as proporções de luz azul, A, vermelha, Vm, e verde, Vd, com o logaritmo natural da produtividade de lipídeos,  $\ln(Po)$ .

$$\ln(Po) = 0,211A + 0,165Vm + 0,270Vd + 2,783AVm + 0,075AVd - 0,520VmVd - 21,488AVmVd \dots\dots(26)$$

$$\ln(Po) = 3,171A + 0,949Vm + 1,381Vd + 6,225AVm + 6,005AVd + 10,217VmVd - 30,2878AVmVd \dots\dots(27)$$



Figura 34: Modelagem obtida para a Po da *Dunaliella salina* cultivada: (a) sem acetato; (b) com acetato.



Fonte: STATSOFT (2018).

Com relação às interações entre as variáveis de entrada, as quadráticas, duas a duas, apresentaram, de um modo geral, intensidades significativas e positivas. Este é um reflexo do fato de os melhores resultados de produtividade lipídica obtidos para cada planejamento, serem alcançados quando dois  $\lambda$ s foram empregados simultaneamente na iluminação.

As interações cúbicas também foram significativas, porém negativas. Relacionadas ao fato de a luz branca ter resultado em menor valor de Po, em relação às combinações de cores

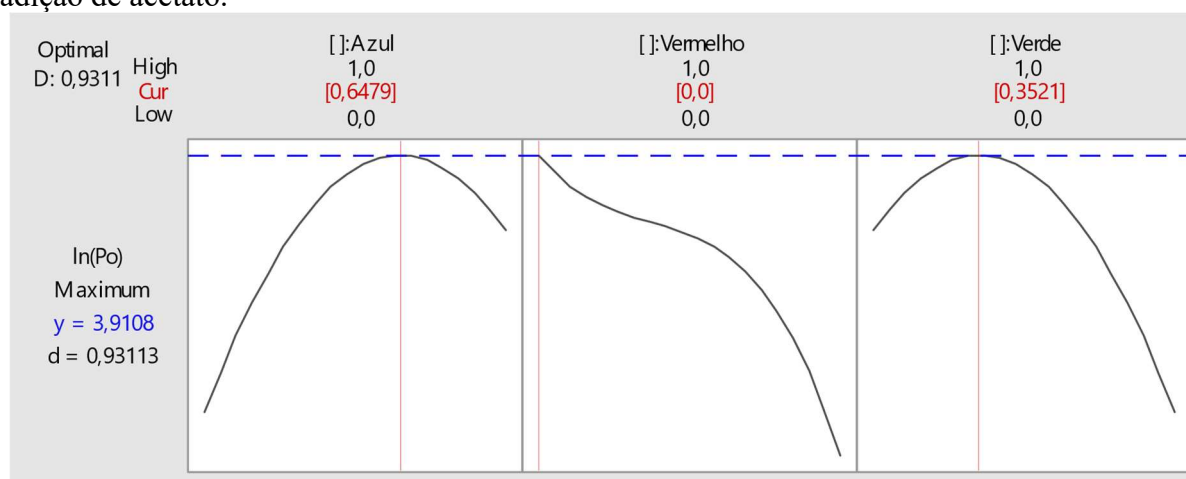
duas a duas. Isto é facilmente visualizado nos gráficos e nos modelos matemáticos obtidos (vide Equação 26, Equação 27 e Figura 34).

Ao observar a Figura 34, fica claro como a presença ou ausência de acetato influencia na mudança do comportamento do cultivo. Entre elas, percebe-se que a luz vermelha ou verde, usadas isoladamente, geram os piores resultados de  $P_o$  para o cultivo realizado na presença de acetato. Entretanto, esse efeito não foi constatado para o cultivo autotrófico (ausência de acetato). O uso isolado da luz azul apresenta resultados intermediários para ambos os planejamentos. Por outro lado, o uso da luz branca ( $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{3}$ ) não forneceu os melhores resultados em nenhum dos casos.

Conciderando que os resultados do planejamento com acetato resultaram em maiores valores de  $P_o$ , e visando obter elevada produtividade, foi empregada uma ferramenta do Minitab de otimização por *desirability*. Para a configuração do otimizador, foi utilizado um mínimo valor de 0 e um máximo de 4,2 para a  $V_s \ln(P_o)$ . Estes valores correspondem à uma faixa de 1 a  $66,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de  $P_o$ . Sendo  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  uma  $P_o$  muito baixa em relação às obtidas na Etapa III, significando ser proibitivo obter valor inferior à este. Ademais,  $66,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  é um valor razoavelmente acima do máximo obtido na Tabela 20, servindo de alvo para o software. Também, o valor adotado de  $r$ , vide equação 16, foi de 1, valor equilibrado com relação linear entre *desirability* e valores de  $V_s, \ln(P_o)$ .

A resposta apresentada pode ser visualizada na Figura 35. Pela análise da figura, percebe-se um valor de *desirability* 0,9311, próximo ao intervalo superior estipulado. Este resultado, que favorece o aumento da  $P_o$ , é com 64,79% de luz azul e 35,21% de luz verde.

Figura 35: Resultado do otimizador por *desirability* do Minitab para o modelo de mistura com adição de acetato.



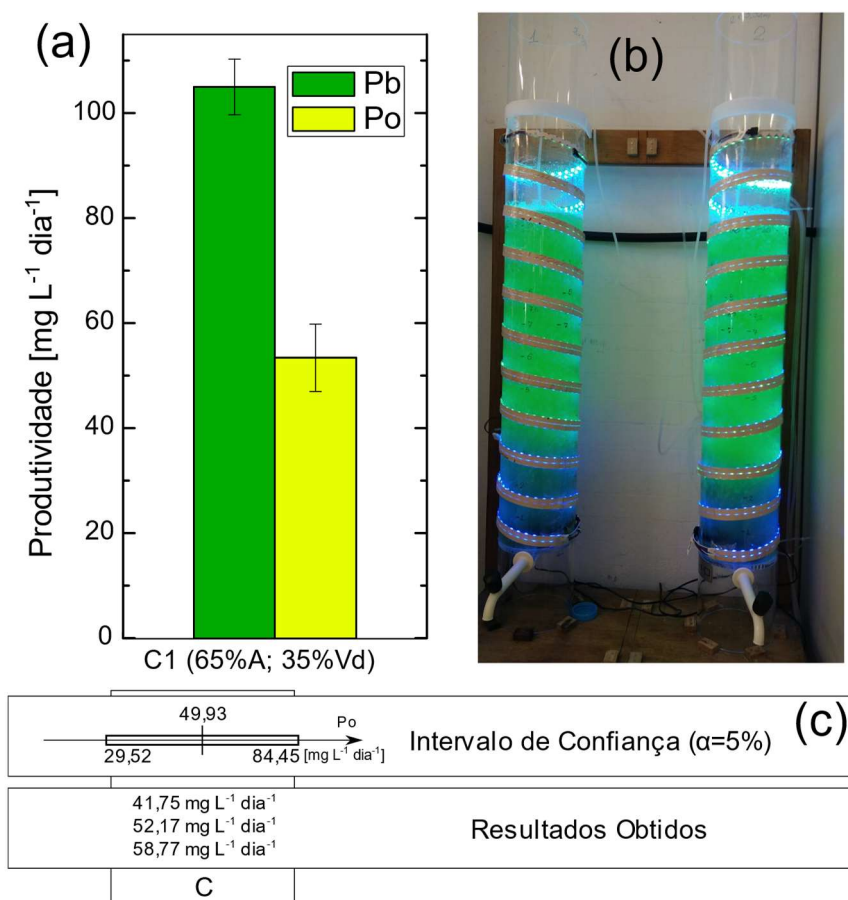
Fonte: MINITAB INC. (2018).

Para verificar esta condição, foi feito um experimento confirmatório, usando acetato ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) e trabalhando com 65% de luz azul e 35% de luz verde, condição denominada C (confirmatório). Os arredondamentos são necessários devido a dificuldades experimentais no ajuste dos valores das  $V_e$ . Esta condição de iluminação gera uma resposta prevista de  $P_o=49,93 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Construindo-se um intervalo de confiança de 5% de significância para este valor temos uma resposta esperada entre 29,52 e  $84,45 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

A condição C, conduzida com 65% de luz azul e 35% de luz verde, obteve  $P_b$  de  $105,06 \pm 5,26 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  e  $P_o$  de  $53,47 \pm 6,40 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Estes resultados estão graficamente representados na Figura 36, que também ilustra o intervalo de confiança para o valor previsto de  $P_o$  pelo modelo ( $\alpha=5\%$ ) e os fotobiorreatores operando nesta condição.

Pela Figura 36 percebe-se que os resultados empíricos de  $P_o$  na condição C estão contidos no intervalo de confiança estipulado. Fato que demonstra boa aderência e aplicabilidade ao modelo desenvolvido.

Figura 36: (a) Resultados de  $P_o$  e  $P_b$  da condição C (b) Fotobiorreatores em operação na condição C (c) intervalo de confiança ( $\alpha=5\%$ ) para o valor de  $P_o$  predito pelo modelo.



Com relação aos resultados do planejamento de mistura, é importante ressaltar o grande incremento nos valores de produtividade lipídica resultantes dessa etapa de trabalho. O maior resultado de  $P_o$ , obtido em etapa anterior ( $16,03 \pm 1,56 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) foi aproximadamente três vezes inferior ao da condição C, da ordem de  $53,47 \pm 6,40 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

Com isto, obteve-se bons valores de  $P_o$ , sem a necessidade do acréscimo excessivo de nutrientes, como alguns autores reportam na literatura (Quadros 1 e 2). Esse estudo mostra que, apesar de o ajuste de  $\lambda$  requer investimento em LEDs de cores específicas, ele propicia um grande aumento de  $P_o$ . Ademais, existe a elevada durabilidade e o baixo consumo energético dos LEDs. Outro fator é o elevado teor lipídico da biomassa do experimento C, 50,89%, fator que facilita e torna mais rentável a extração do óleo.

Com relação aos dados da literatura, Helena; Zainuri e Suprijanto (2016), trabalhando com diversos meios de cultivo, verificaram grande variação na máxima densidade celular dos cultivos da *D. salina* quando a iluminação era mudada de azul para vermelha. Segundo este trabalho, sob as condições de cultivo que foram empregadas, a iluminação vermelha tem maior favorecimento ao crescimento celular em relação à luz azul. Os dados reportados por Helena; Zainuri e Suprijanto (2016) se assemelham ao comportamento apresentado pelos experimentos aqui conduzidos com apenas luz azul ou apenas luz vermelha, sem acetato, mostrando  $P_b$  sutilmente maior para luz vermelha,  $13,35 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , em relação à azul,  $11,43 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

Woong *et al.* (2014) também estudaram a influência das cores azul, vermelha e branca na iluminação de cultivos, porém para a microalga *N. gaditana*. Em seus estudos foi implementado um cultivo contínuo. As cores da iluminação foram mudadas ao longo de um mesmo cultivo e foi esperado se obter um estágio estacionário para colher os resultados. De acordo com os autores, a luz vermelha foi a que apresentou maior produtividade celular, em detrimento às iluminações azul e branca. Ainda segundo dados reportados por Woong *et al.* (2014), o melhor teor de FAMES foi obtido sob a influência da luz vermelha. De modo similar, quando se analisa os resultados do presente trabalho para o planejamento sem acetato, percebe-se que a iluminação vermelha é a que gera maior  $P_o$  em relação ao uso da luz branca ou azul.

Okumura *et al.* (2015), cultivando a microalga *Botryococcus braunii*, também testaram o uso da iluminação com diferentes  $\lambda_s$ , nas faixas do azul, verde e vermelho, além das combinações destas cores. Neste trabalho, as combinações dois a dois também geraram boas produções de biomassa. Contudo, a maior produção foi obtida pela união das três cores (luz branca). Comportamento diferente do observado no presente trabalho para a *D. salina*.

Provavelmente, uma disparidade relacionada ao fato de se tratar de espécies diferentes de microalgas.

Abiusi *et al.* (2014) estudaram a microalga *Tetraselmis suecica* sob iluminação branca, azul, verde e vermelha. Em seu estudo, a melhor produtividade de biomassa foi obtida pela luz branca, 183,33 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, seguida pela luz azul, 175,56 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. Neste mesmo estudo, o teor de lipídeos para o cultivo de iluminação branca foi de 19,0%, menor em relação ao de luz azul, 21,8%. Os cultivos sob luz verde e vermelha obtiveram resultados inferiores em termos de teor de lipídeos (ABIUSI *et al.*, 2014). Os resultados diferem dos reportados por este trabalho para o planejamento sem acetato, possivelmente devido ao fato de se tratar de espécies distintas de microalgas.

A diferença de comportamento das espécies de microalga com relação ao  $\lambda$ , comprimento de onda, da iluminação também pode ser verificada no trabalho de Ra *et al.* (2018) Os autores cultivaram quatro diferentes espécies de microalgas sob iluminação branca, azul ou sob a mistura das cores vermelha e azul. Percebe-se, pelos resultados de Ra *et al.* (2018) diferenças entre os comportamentos das microalgas. A segunda iluminação com melhor produção celular para a maioria das espécies estudadas pelos autores foi à vermelha (*Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis oceanica* e *Phaeodactylum tricorutum*) (RA *et al.*, 2018). O segundo melhor resultado da *Isochrysis galbana*, por outro lado, foi com a luz azul, diferente das demais. Todas as microalgas apresentaram a semelhança de ter a maior produtividade celular quando expostas à mistura dos  $\lambda$ s vermelho e azul. Esta última característica se assemelha com os resultados do planejamento de mistura sem acetato proposto no presente trabalho.

Zhong, Jin e Cheng (2018) também verificaram a influência do  $\lambda$  sobre a produtividade celular das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus obliquus*. Dentre as condições testadas (iluminação branca, azul ou vermelha), a maioria das microalgas apresentou melhor produção celular sob a luz azul. A microalga *Scenedesmus obliquus*, ao contrário das demais apresentadas pelos autores e dos resultados obtidos no presente trabalho, não sofreu substancial variação em sua produção celular em função de  $\lambda$  (ZHONG; JIN; CHENG, 2018).

O perfil de ácidos graxos obtido em cada condição experimental do planejamento de mistura, na presença de acetato no meio de cultivo, está apresentado na Tabela 23. Nela estão representadas as combinações de  $\lambda$ s nas faixas do azul (A), Vermelho (Vm) e Verde (Vd), incluindo a combinação das três cores, luz branca (B-). O resultado do experimento confirmatório, C, também é apresentado.

Com base nos resultados da Tabela 23, percebe-se certas alterações no perfil de ácidos graxos em função do  $\lambda$ . O ácido graxo palmítico (C16:0), por exemplo, apresentou valores aproximadamente constantes para quase todas as condições, variando de 17,42 a 18,5%. A exceção foi o valor obtido sob iluminação AVm, 8,10%, razoavelmente baixo em relação à literatura apresentada nos Quadros 2 e 3. Hultberg *et al.* (2014), quando cultivou a microalga *Chlorella vulgaris* sob diversas cores de iluminação (branca, azul, verde, vermelha, amarela (VmVd) e roxa (AVm)) também observaram flutuações no teor de C16:0. Os autores verificaram que o teor de C16:0 variou de 16,7% (luz branca) até 20,4% (VmVd), sendo que a iluminação AVm obteve um valor intermediário de C16:0 (18,1%). Abiusi *et al.* (2014), na realização do cultivo da microalga *Tetraselmis suecica*, sob iluminação branca, azul, verde e vermelha também constataram variações no teor de C16:0. Neste trabalho, os resultados variaram de 16,39% (luz branca) até 21,88% (luz azul).

Tabela 23: Perfil de AGs da *D. salina* do planejamento de mistura com acetato de sódio<sup>7</sup>

| FAME    | A     | Vm    | Vd    | AVd   | AVm   | VmVd  | B-    | C     |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C8:0    | 0,78  | -     | 0,99  | 1,27  | 0,81  | 1,15  | 0,77  | 0,85  |
| C10:0   | 0,23  | -     | 0,28  | 0,31  | 0,24  | 0,30  | 0,25  | 0,33  |
| C11:0   | 0,08  | -     | 0,11  | 0,17  | 0,12  | 0,16  | -     | -     |
| C12:0   | 1,76  | 1,14  | 1,71  | 2,01  | 1,83  | 2,02  | 1,86  | 2,42  |
| C14:0   | 0,73  | 0,90  | 0,75  | 0,80  | 0,77  | 0,80  | 0,78  | 0,98  |
| C16:1   | 2,85  | 3,28  | 2,18  | 2,05  | 2,79  | 2,38  | 3,10  | 2,85  |
| C16:0   | 17,83 | 18,50 | 17,86 | 17,87 | 8,10  | 17,42 | 18,43 | 18,31 |
| C17:0   | 0,08  | 1,80  | 0,27  | 0,20  | 0,15  | 0,23  | -     | -     |
| C18:3n3 | 0,13  | 1,86  | 0,63  | -     | -     | -     | -     | 0,36  |
| C18:2n6 | -     | 5,27  | 2,91  | -     | 0,25  | -     | 0,70  | 0,83  |
| C18:1n9 | 37,43 | 34,02 | 29,00 | 25,29 | 35,85 | 26,79 | 38,47 | 36,52 |
| C18:0   | 3,64  | 3,21  | 3,86  | 3,91  | 3,93  | 3,95  | 3,93  | 3,61  |
| C20:4n6 | 0,13  | -     | 0,12  | -     | 0,23  | 0,16  | 0,21  | -     |
| C20:5n3 | 0,10  | -     | 0,12  | 0,13  | -     | 0,16  | -     | -     |
| C20:3n6 | 0,18  | 1,38  | 0,38  | 0,27  | -     | 0,23  | -     | 0,21  |
| C20:2   | 0,57  | -     | 0,20  | 0,50  | 0,38  | 0,55  | 0,35  | 0,32  |
| C20:1n9 | 0,46  | -     | 0,45  | 0,47  | 0,33  | 0,55  | 0,42  | 0,25  |
| C20:0   | 0,73  | -     | 0,93  | 0,82  | 0,75  | 0,83  | 0,71  | 0,81  |
| C21:0   | -     | -     | 1,62  | 1,88  | 1,49  | 0,98  | 1,04  | 1,01  |
| C22:2   | 1,10  | -     | 0,84  | 1,90  | 1,13  | 1,51  | 0,70  | 0,72  |
| C22:1n9 | 1,23  | -     | 0,41  | 0,97  | 0,51  | 1,20  | -     | -     |
| C22:0   | -     | -     | 0,17  | 0,20  | -     | 0,20  | -     | -     |

Fonte: Produção do próprio autor

<sup>7</sup> Teores dos ácidos graxos em %m/m.

Os teores obtidos para o ácido oleico (C18:1n9) apresentaram uma variação significativa de acordo com a condição de cultivo empregada, da ordem de 25,29% (AVd) a 38,47% (B-). Valores estes, substancialmente superiores aos reportados pela literatura (Quadros 2 e 3). Hultberg *et al.* (2014), por sua vez, reportou seu maior teor de C18:1n9 de 3,5% sob iluminação azul. Abiusi *et al.* (2014), também utilizando iluminação azul, obteve um máximo de 26,78% de C18:1n9. Resultado superior ao de Hultberg *et al.* (2014), porém inferior ao obtido no presente trabalho (37,43% para a iluminação azul).

Os ácidos graxos esteárico, C18:0, linoleico, C18:2n3 e  $\gamma$ -linolênico, C18:3n3, por sua vez, apresentaram menor faixa de variação de resultados. A condição que favoreceu as maiores concentrações possíveis destes ácidos graxos, em apenas um experimento, foi sob a iluminação vermelha. Nesta condição, foram obtidos 3,95% de C18:0, 5,27% de C18:2n6 e 1,86% de C18:3n3. Hultberg *et al.* (2014) obteve o valor máximo de C18:2n6 de 7,7%, semelhante ao aqui obtido, porém sob iluminação amarela, VmVd. Os resultados de Hultberg *et al.* (2014), contudo, apresentam valores de C18:3n3 bastante superiores, com um máximo de 47,0%, sob iluminação verde. O maior teor de C18:2n6 obtido por Abiusi *et al.* (2014) foi de 8,78%, semelhante ao encontrado por este trabalho, porém sob iluminação azul. Estes autores obtiveram, com o uso de iluminação branca, um máximo de 20,07% de C18:3n3, quantidade inferior ao de Hultberg *et al.* (2014), porém superior ao do presente trabalho.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma influência bastante significativa do comprimento de onda da luz ( $\lambda$ ) empregado no cultivo de microalgas sobre os parâmetros de produtividade de biomassa (Pb), produtividade lipídica (Po) e o perfil de ácidos graxos. Tais resultados apresentam semelhanças com os dados reportados na literatura, porém com algumas divergências, visto que o comportamento de uma microalga em relação ao  $\lambda$  não segue um padrão rígido, variando para diferentes espécies estudadas e meios de cultivo utilizados.

## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

### 5.1 VERIFICAÇÃO DOS OBJETIVOS E RESPOSTAS ÀS QUESTÕES DE PESQUISA

Com relação aos dados obtidos, pôde-se chegar as seguintes conclusões:

- ❖ Dentro da faixa de concentrações estudada, de 0 a 2 g L<sup>-1</sup>, o uso de bicarbonato de sódio, como fonte inorgânica de carbono, favoreceu a Pb de ambas as microalgas estudadas (*N. gaditana* e *D. salina*). Contudo, não influenciou positivamente a Po.
- ❖ Com relação ao nitrato e o acetato de sódio, ambos favorecem a produtividade de biomassa, Pb, e de lipídeos, Po, das microalgas estudadas;
- ❖ Dentre as condições de meio de cultivo estudadas, as que mais favorecem as produtividades dos cultivos são:
  - 150 mg L<sup>-1</sup> de nitrato e 4 g L<sup>-1</sup> de acetato para a *D. salina*;
  - 225 mg L<sup>-1</sup> de nitrato e 6 g L<sup>-1</sup> de acetato para a *N. gaditana*.
- ❖ Na melhor condição de cultivo, da segunda tapa os principais AG produzidos foram:
  - *N. gaditana*: C18:1, C18:2 e C16:0 (23,4; 17,07 e 22,18%, respectivamente);
  - *D. salina*: C18:1, C18:2, C12:0 e C16:0 (27,48; 14,65, 20,40 e 10,37%, respectivamente).
- ❖ O acetato de sódio pode influenciar no metabolismo das microalgas estudadas reduzindo a produção de alguns AGs, tais como o C20:5 para o caso da *N. gaditana* e o C18:3 para o caso da *D. salina*.
- ❖ A utilização ou não de acetato como fonte de carbono para o cultivo da microalga *D. salina* fez com que a Po apresentasse diferentes comportamentos em função de  $\lambda$ ;
- ❖ O comprimento de onda,  $\lambda$ , da iluminação utilizada no cultivo da microalga *D. salina* apresentou grande influência sobre sua produtividade de lipídeos, Po. A maior Po obtida para a *D. salina*, foi utilizando uma iluminação que misturava 65% de luz azul e 35% de luz verde (C), obtendo 53,47 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. Resultado que obteve também o maior teor de lipídeos observado no presente trabalho, 50,89%;
- ❖ Na melhor condição de produtividade, Po, da *D. salina* na terceira etapa (C), os principais AGs foram: C16:0 e C18:1 (18,31 e 36,52%, respectivamente).



## 5.2 CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO

Com o término do trabalho, verificou-se dentre as principais contribuições à possibilidade de utilização de uma nova fonte de carbono no cultivo, acetato de sódio. Este nutriente, pouco explorado na literatura, apresentou excelentes resultados para as microalgas estudadas.

O estudo da iluminação dos fotobiorreatores com diferentes comprimentos de onda também apresentou contribuições significativas, visto que foi possível incrementar a produtividade de lipídeos sem a adição excessiva de nutrientes ao meio de cultivo.

O uso do planejamento de mistura também foi bastante significativo no estudo da influência do comprimento de onda sobre a produtividade dos cultivos. Uma aplicação ainda não encontrada na literatura para esta ferramenta de planejamento de experimentos (*DOE*).

## 5.3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- ❖ Testar fontes de nitrogênio alternativas em substituição ao nitrato tradicional, como ureia, aminoácidos etc.
- ❖ Empregar nutrientes de baixo valor em substituição aos reagentes de padrão analítico, para a composição do meio de cultivo das microalgas, como por exemplo, fertilizantes, que podem reduzir o custo final da obtenção de biomassa;
- ❖ Avaliar o efeito de  $\lambda$  sobre a produtividade do cultivo de outras espécies de microalgas;
- ❖ Utilizar otimização de Monte Carlo na função de planejamento de mistura da terceira etapa para obtenção da melhor condição de iluminação.

## REFERÊNCIAS

- ABEDINI NAJAFABADI, H. *et al.* Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 180, p. 311–317, 2015.
- ABIUSI, F. *et al.* Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 111, n. 5, p. 956–964, 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, London, v. 159, p. 52–67, 2015.
- AL HATTAB, M.; GHALY, A.; PÉREZ DE LOS RÍOS, A. Production of biodiesel from marine and freshwater microalgae: a review. **Advances in Research**, v. 3, n. 24, p. 107–155, 2015.
- AOCS. **Society official methods and recommended practices of the AOCS**. 5. ed. Champaign: AOCS Press, 2004.
- ÁVILA-ROMÁN, J. *et al.* Microalgae-derived oxylipins decrease inflammatory mediators by regulating the subcellular location of NF $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$ . **Pharmacological Research**, London, v. 128, p. 220–230, 2018.
- AXELSSON, L. *et al.* Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 6, p. 246–256, 2012.
- BELLOU, S. *et al.* Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, New York, v. 32, n. 8, p. 1476–1493, 2014.
- BERNARD, O. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO<sub>2</sub> mitigation and biofuel production. **Journal of Process Control**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 1378–1389, 2011.
- BERTRAND, J. W. M.; FRANSOO, J. C. Operations management research methodologies using quantitative modeling. **International Journal of Operations and Production Management**, v. 22, n. 2, p. 241–264, 2002.
- BHUVANESHWARI, M. *et al.* Toxicity and trophic transfer of P25 TiO<sub>2</sub> NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: effect of dietary and waterborne exposure. **Environmental Research**, San Diego, v. 160, n. jul. 2017, p. 39–46, 2018.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: the brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, 2017.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557–577, 2010.

BWAPWA, J. K.; ANANDRAJ, A.; TROIS, C. Possibilities for conversion of microalgae oil into aviation fuel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 1345–1354, 2017.

CANCELA, A. *et al.* Exploitation of *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel and pellet production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 133, p. 725–730, 2019.

CARRERO, A. *et al.* Synthesis of fatty acids methyl esters (FAMES) from *Nannochloropsis gaditana* microalga using heterogeneous acid catalysts. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 97, p. 119–124, 2015.

CARVALHO, A. K. F. *et al.* Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485–493, 2013.

CARVALHO, J. C. M. *et al.* Microalgae bioreactors. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (ed.). **Algal biorefineries**. New York: Springer, 2014. p. 83–126.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 110, p. 510–516, 2012.

CHEN, X. *et al.* *Dunaliella salina* Hsp90 is halotolerant. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 75, p. 418–425, 2015a.

CHEN, Y. *et al.* Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 106, p. 61–72, dez. 2015b.

CHO, K. *et al.* Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 72, p. 1–7, 2015.

CHO, K. *et al.* Bioflocculation of the oceanic microalga *Dunaliella salina* by the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, and its effect on biodiesel properties of the biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 202, p. 257–261, 2016a.

CHO, K. *et al.* Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. **Algal Research**, v. 17, p. 61–66, 2016b.

CUSTÓDIO, L. *et al.* Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 26, p. 151–161, 2014.

DA RÓS, P. C. M. *et al.* Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. **Marine Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2365–2381, 2013.

DEGENS, B. P. *et al.* Net acidity indicates the whole effluent toxicity of pH and dissolved metals in metalliferous saline waters. **Chemosphere**, Oxford, v. 198, p. 492–500, 2018.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, Milwaukee, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

EL ARROUSSI, H. *et al.* Screening of marine microalgae strains from Moroccan coasts for biodiesel production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 113, p. 1515–1522, 2017.

FABRA, M. J. *et al.* Development and characterization of hybrid corn starch-microalgae films: effect of ultrasound pre-treatment on structural, barrier and mechanical performance. **Algal Research**, v. 28, n. November, p. 80–87, 2017.

FERREIRA, M. *et al.* Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus* sp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 491, n. March, p. 351–357, 2018.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple Method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497–509, 1956.

FULKE, A. B. *et al.* Biosequestration of carbon dioxide, biomass, calorific value and biodiesel precursors production using a novel flask culture photobioreactor. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 72, p. 136–142, 2015.

GANESAN, B.; BROTHERSEN, C.; MCMAHON, D. J. Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 54, n. 1, p. 98–114, 2014.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, Essex, v. 147, p. 484–491, 2013.

GE, Y. *et al.* Quantitative proteomic analysis of *Dunaliella salina* upon acute arsenate exposure. **Chemosphere**, Oxford, v. 145, p. 112–118, 2016.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition: mineral nutrition. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 97–115.

GUILLARD, R. R. L. Culture of marine invertebrate animals. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (ed.). **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Springer, 1975. p. 29–60.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

HELENA, S.; ZAINURI, M.; SUPRIJANTO, J. Microalgae *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) growth using the LED light (light limiting dioda) and different media. **Aquatic Procedia**, v. 7, p. 226–230, 2016.

HOU, Y. *et al.* CAH1 and CAH2 as key enzymes required for high bicarbonate tolerance of a novel microalga *Dunaliella salina* HTBS. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 87–88, p. 17–23, 2016.

HSU, Y. *et al.* Protective effects of *Dunaliella salina*: a carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 3311–3317, 2008.

HULTBERG, M. *et al.* Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 159, p. 465–467, 2014.

JANSSEN, J. H. *et al.* Effect of nitrogen addition on lipid productivity of nitrogen starved *Nannochloropsis gaditana*. **Algal Research**, v. 33, n. may, p. 125–132, 2018.

JAYAPPRIYAN, K. R. *et al.* In vitro anticancer activity of natural Beta-carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 99–105, 2013.

JAZZAR, S. *et al.* Direct supercritical methanolysis of wet and dry unwashed marine microalgae (*Nannochloropsis gaditana*) to biodiesel. **Applied Energy**, London, v. 148, p. 210–219, 2015.

JEON, H. *et al.* Identification of the carbonic anhydrases from the unicellular green alga *Dunaliella salina* strain CCAP 19 / 18. **Algal**, v. 19, p. 12–20, 2016.

KANNAN, D. C.; PATTARKINE, V. M. Algal biorefineries. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (ed.). **Algal biorefineries**. New York: Springer, 2014. p. 296–310.

KEERTHI, S.; DEVI, U.; SARMA, S. The heterotrophic eubacterial and archaeal co-inhabitants of the halophilic *Dunaliella salina* in solar salterns fed by Bay of Bengal along south eastern coast of India. **Saudi journal of biological sciences**, 2015.

KHADIM, S. R. *et al.* Mass cultivation of *Dunaliella salina* in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting. **Bioresource Technology**, Essex, v. 270, p. 20–29, 2018.

KIM, G. Y. *et al.* Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. **Bioresource Technology**, Essex, v. 237, p. 72–77, 2017.

KUMAR, R. S.; SURESHKUMAR, K.; VELRAJ, R. Optimization of biodiesel production from *Manilkara zapota* (L.) seed oil using Taguchi method. **Fuel**, London, v. 140, p. 90–96, 2015.

LEU, S.; BOUSSIBA, S. Advances in the production of high-value products by microalgae. **Industrial Biotechnology**, Swansea, v. 10, n. 3, p. 169–183, 2014.

LI, C. *et al.* Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 680–684, 2014.

- LIN, H. *et al.* Regulation of virus-induced inflammatory response by *Dunaliella salina* alga extract in macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 71, p. 159–165, 2014.
- LIU, J. Interspecific biodiversity enhances biomass and lipid productivity of microalgae as biofuel feedstock. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 25–33, 2016.
- LÓPEZ, E. N. *et al.* Enzymatic production of biodiesel from *Nannochloropsis gaditana* lipids : influence of operational variables and polar lipid content. **Bioresource Technology**, Essex, v. 187, p. 346–353, 2015.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 588 p.
- LOURES, C. C. A. *et al.* Simultaneous esterification and transesterification of microbial oil from *Chlorella minutissima* by acid catalysis route: A comparison between homogeneous and heterogeneous catalysts. **Fuel**, London, v. 211, n. September 2017, p. 261–268, 2018.
- LUCKER, B. F. *et al.* The environmental photobioreactor (ePBR): an algal culturing platform for simulating dynamic natural environments. **Algal Research**, v. 6, p. 242–249, 2014.
- MARKLEY, K. S. **Fatty acids**. New York: Interscience, 1969.
- MARTINS, D. A. *et al.* Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2259–2281, 2013.
- MATOS, Â. P. *et al.* Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 197, p. 48–55, 2015.
- MATOS, Â. P. *et al.* Effects of different photoperiod and trophic conditions on biomass , protein and lipid production by the marine alga *Nannochloropsis gaditana* at optimal concentration of desalination concentrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 224, p. 490–497, 2017.
- MIGUEL, P. A. C. *et al.* **Metodologia de pesquisa em engenharia de produção e gestão de operações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2012.
- MILLAO, S.; UQUICHE, E. Antioxidant activity of supercritical extracts from *Nannochloropsis gaditana*: Correlation with its content of carotenoids and tocopherols. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 143–150, 2016.
- MINITAB INC. **Software estatístico Minitab 17**. Disponível em <http://www.minitab.com>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- MITRA, M. *et al.* A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production. **Algal Research**, v. 8, p. 161–167, 2015.
- MONTE, J. *et al.* Harvesting of *Dunaliella salina* by membrane filtration at pilot scale. **Separation and Purification Technology**, v. 190, n. apr. 2017, p. 252–260, 2018.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 8. ed. New York: John Wiley & Sons, 2013.

MORAES, L. *et al.* Engineering strategies for the enhancement of *Nannochloropsis gaditana* outdoor production: influence of the CO<sub>2</sub> flow rate on the culture performance in tubular photobioreactors. **Process Biochemistry**, London, v. 76, p. 171–177, 2019.

MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 217–223, 2016.

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

NALDER, T. D.; MILLER, M. R.; PACKER, M. A. Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis* sp. (T-Iso) grown in batch culture. **Aquaculture International**, London, v. 23, n. 5, p. 1293–1312, 2015.

OKUMURA, C. *et al.* Economic efficiency of different light wavelengths and intensities using LEDs for the cultivation of green microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for biofuel production. **Environmental Progress & Sustainable energy**, Hoboken, v. 34, n. 1, p. 269–275, 2015.

ONAY, M. Bioethanol production from *Nannochloropsis gaditana* in municipal wastewater. **Energy Procedia**, v. 153, p. 253–257, 2018.

PEDRO, A. S. *et al.* Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in raceway ponds. **Algal Research**, v. 8, p. 205–213, 2015.

PEDRO, A. S. *et al.* Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in flat: panel photobioreactors. **Algal Research**, v. 18, p. 156–165, 2016.

PEÑA, E. H. *et al.* Extraction of free fatty acids from wet *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 75, p. 366–373, 2015.

PIRWITZ, K.; RIHKO-STRUCKMANN, L.; SUNDMACHER, K. Comparison of flocculation methods for harvesting *Dunaliella*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 196, p. 145–152, 2015.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 9, n. 3, p. 165–177, 2009.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 635–648, 2004.

RA, C. H. *et al.* Effects of light-emitting diode (LED) with a mixture of wavelengths on the growth and lipid content of microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 41, n. 4, p. 457–465, 2018.

RASDI, N. W.; QIN, J. G. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 27, n. 6, p. 2221–2230, 2015.

RUPEREZ, F. J. *et al.* *Dunaliella salina* extract effect on diabetic rats : metabolic fingerprinting and target metabolite analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 49, p. 786–792, 2009.

RYCKEBOSCH, E. *et al.* Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. **Food chemistry**, London, v. 160, p. 393–400, 2014.

SABZALIAN, M. R. *et al.* High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 4, p. 879–886, 2014.

SAHA, S. K.; MOANE, S.; MURRAY, P. Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19 / 18. **Bioresource Technology**, Essex, v. 147, p. 23–28, 2013.

SAN PEDRO, A. *et al.* Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 169, p. 667–676, 2014.

SAWAENGSAK, W. *et al.* Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. **Energy for Sustainable Development**, Bangalore, v. 18, p. 67–74, 2014.

SCOPUS. **Base de dados bibliográficos:** pesquisa. Disponível em: <https://www.scopus.com/search>. Acesso em: 13 jan. 2019.

SELVAKUMAR, P.; UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180–185, 2014.

SENDRA, M. *et al.* Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. **Environment International**, New York, v. 98, p. 62–68, 2017.

SHAH, A. R. *et al.* Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of *Nannochloropsis gaditana*. **Algal Research**, v. 26, n. August, p. 354–364, 2017.

SHARMA, K.; SCHENK, P. M. Rapid induction of omega-3 fatty acids (EPA) in *Nannochloropsis* sp. by UV-C radiation. **Biotechnology and bioengineering**. New York, v. 112, n. 6, p. 1243–1249, 2015.

SIMON, M.; BONE, K. How to use the monographs. In: **Principles and practice of phytotherapy**. 2. ed. Edinburgh: Elsevier, 2013. p. 353–961.

STATSOFT. **Software Statistica 12.** Disponível em <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA>. Acesso em: 20 nov. 2018.



SUNG, M. *et al.* Enhancement of lipid productivity by adopting multi-stage continuous cultivation strategy in *Nannochloropsis gaditana*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 229, p. 20–25, 2017.

TAGUCHI, G. **Introduction to quality engineering**. Tóquio: Asian Productivity Organization, 1986. 191 p.

TAGUCHI, G. *et al.* Introduction to the signal-to-noise ratio. In: TAGUCHI, S.; YANO, H. (Eds.). **Taguchi's quality engineering handbook**. Hoboken: John Wiley & Sons, inc, 2005. p. 223–238.

TAGUCHI, G.; CHOWDHURY, S.; YUIN, W. Introduction to orthogonal arrays. In: TAGUCHI, S.; YANO, H. (ed.). **Taguchi's quality engineering handbook**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. p. 584–596.

TEO, C. L. *et al.* Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. **Bioresource Technology**, Essex, v. 162, p. 38–44, 2014.

TEULING, E. *et al.* Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 479, n. apr., p. 490–500, 2017.

TOMASELLI, L. The microalgae: with reference to mass-cultivation. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 3–19.

WAN, C. *et al.* Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 184, p. 251–257, 2015.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 12, p. 3627–3652, 2005.

WOONG, C. *et al.* Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 159, p. 30–35, 2014.

YAN, C. *et al.* Influence of influent methane concentration on biogas upgrading and biogas slurry purification under various LED (light-emitting diode) light wavelengths using *Chlorella* sp. **Energy**, Oxford, v. 69, p. 419–426, 2014.

YAN, C.; ZHENG, Z. Performance of mixed LED light wavelengths on biogas upgrade and biogas fluid removal by microalga *Chlorella* sp. **Applied Energy**, London, v. 113, p. 1008–1014, 2014.

YUSUF, C. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

ZHENG, Z. *et al.* The enhancement of the oxidative pentose phosphate pathway maybe involved in resolving imbalance between photosystem I and II in *Dunaliella salina*. **Algal Research**, v. 26, p. 402–408, 2017.

ZHONG, Y.; JIN, P.; CHENG, J. J. A comprehensive comparable study of the physiological properties of four microalgal species under different light wavelength conditions. **Planta**, v. 248, n. 2, p. 489–498, 2018.

ZHU, C. *et al.* Seawater desalination concentrate for cultivation of *Dunaliella salina* with floating photobioreactor to produce  $\beta$ -carotene. **Algal Research**, v. 35, n. aug., p. 319–324, 2018.