

**DANIELA ERCOLE DALE LUCHE**

**Avaliação da produção de biomassa e clorofila pela microalga *Chlorella*  
*minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos**

**Daniela Ercole Dale Luche**

**Avaliação da produção de biomassa e clorofila pela microalga *Chlorella*  
*minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção na área de Otimização, simulação e tomada de decisão.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bruna Caroline Marques Gonçalves

L936a	<p>Luche, Daniela Ercole Dale</p> <p>Avaliação da produção de biomassa e clorofila pela microalga <i>Chlorella minutissima</i> em presença de fármacos antimicrobianos / Daniela Ercole Dale Luche – Guaratinguetá, 2020.</p> <p>125 f : il.</p> <p>Bibliografia: f. 85</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2020.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva</p> <p>Coorientadora: Profª Drª Bruna Caroline Marques Gonçalves</p> <p>1. Biomassa. 2. Antibacterianos. 3. Antimicóticos. 4. Taguchi, métodos (Controle de qualidade). I. Título.</p> <p>CDU 620.91(043)</p>
-------	---

**DANIELA ERCOLE DALE LUCHE**

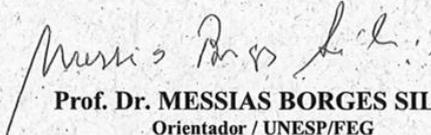
ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
"MESTRE EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO"

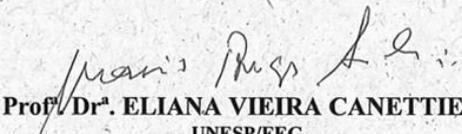
PROGRAMA: ENGENHARIA DE PRODUÇÃO  
CURSO: Mestrado

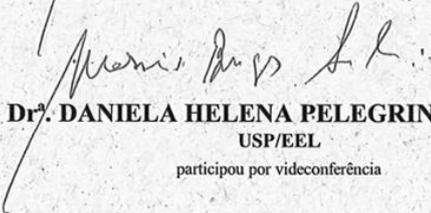
APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

  
Prof. Dr. Otávio José de Oliveira  
Coordenador

**BANCA EXAMINADORA:**

  
Prof. Dr. MESSIAS BORGES SILVA  
Orientador / UNESP/FEG  
participou por videoconferência

  
Prof. Dr. ELIANA VIEIRA CANETTIERI  
UNESP/FEG  
participou por videoconferência

  
Prof. Dr. DANIELA HELENA PELEGRINE GUIMARÃES  
USP/EEL  
participou por videoconferência

Julho de 2020

## **DADOS CURRICULARES**

### **DANIELA ERCOLE DALE LUCHE**

**NASCIMENTO** 28.11.1994 - Santo André - SP

**FILIAÇÃO** Emilio Dale Luche  
Sueli Ercole Dale Luche

**2013/2016** Ciências Biológicas (Bacharelado) - Bióloga  
Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium

**2017/2018** MBA em Gestão da Produção - Especialista em Gestão da  
Produção  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP -  
Campus de Guaratinguetá

Dedico este trabalho à minha família, meus amigos, professores e a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, me apoiaram.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a *Deus*, pela minha vida, minha família, meus amigos e pela força constante que ele me dá, sem a qual, nada conseguiria;

Aos meus pais *Emilio* e *Sueli* que, apesar das dificuldades enfrentadas, sempre incentivaram meus estudos;

Às minhas irmãs *Larissa* e *Letícia* que sempre me apoiaram em minhas escolhas profissionais;

Ao meu tio, *José Roberto Dale Luche*, que também me apoiou bastante durante todo o tempo em que estive em Guaratinguetá;

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Messias Borges Silva*, por ter me dado essa oportunidade de crescimento profissional e pessoal;

À *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna Caroline Marques Gonçalves* pela dedicação e carinho ao dar auxílio durante a fase experimental em laboratório, além de ter transmitido seus conhecimentos e ajudado em todos os momentos de necessidade;

À minha amiga *Maria Helena Queiroz*, pela disposição em me ajudar com os experimentos, escrita de artigos e publicações em eventos;

À *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Vieira Canettieri*, por ceder os laboratórios do Departamento de Energia para a realização da parte experimental deste estudo;

À *República Bico Doce*, por ter me acolhido e ajudado no meu desenvolvimento social;

À *UNESP*, por me ajudar em meu desenvolvimento profissional;

Aos *professores da FEG-UNESP* que, com muita dedicação, colaboram com as atividades de ensino;

À *CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)* pela concessão da bolsa durante todo o período de realização desta pesquisa;

E, de forma especial, a todos os amigos que fiz nesta jornada.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - código de financiamento 001."

“Cada sonho que você deixa para trás, é um  
pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

Esteves Jobs

## RESUMO

Efluentes domésticos são compostos por fármacos capazes de promover a resistência microbiana, portanto precisam ser tratados antes de serem despejados em solo ambiental, e o uso de microalgas surge como alternativa sustentável, pois estes microrganismos têm a capacidade de absorver matéria orgânica acumulada. Deste modo, este estudo objetivou cultivar a microalga *Chlorella minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos sob condições controladas para prevenir a contaminação do cultivo por fungos e bactérias, visando a produção de biomassa diante do método de Taguchi. Foram realizados três experimentos testes: dois em arranjos ortogonais  $L_4$  para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono na de produção de biomassa e para aferir a eficiência na inibição de bactérias no cultivo por meio de antibióticos e, um em arranjo ortogonal  $L_8$  para conferir total inibição de fungos contaminantes no cultivo. O primeiro experimento indicou que a aeração e o mel contribuíram no aumento da produção de clorofila *a*. Já no segundo experimento, o crescimento da microalga foi independente das condições experimentais. Entretanto, no terceiro experimento, o cultivo em presença do antibiótico Ceftriaxona promoveu a contaminação do meio de cultivo por fungos. Por isso, foram realizados testes com adição de antifúngicos. O único antifúngico que não interferiu na coloração do cultivo quando interagido com o antibiótico Ceftriaxona foi o Fluconazol. Portanto, realizou-se um experimento para avaliar o cultivo da *C. minutissima* em presença deste fármaco, o qual indicou que a microalga utilizou a glicose como fonte de carbono orgânico. As maiores concentrações de clorofila *a* e *b* foram, respectivamente, 9,43 mg.L<sup>-1</sup> e 13,34 mg.L<sup>-1</sup>. As fontes de CO<sub>2</sub> contribuíram para as maiores queimas de biomassa (81,75% e 78,98%) durante a análise termogravimétrica, fato que está relacionado com a perda de umidade e degradação térmica do produto. A ANOVA indicou que a iluminação, o Fluconazol e a Glicose são relevantes com  $F_{calc} \geq 2$  para produzir clorofila *a*. Diante desses resultados, pôde-se concluir que o método de Taguchi auxiliou no melhor ajuste das variáveis respostas, indicando que os fármacos utilizados, além de inibirem a contaminação do meio de cultivo, proporcionam a produção de biomassa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antibióticos. Antifúngicos. Delineamento de experimentos. Taguchi. Biomassa.

## ABSTRACT

Domestic effluents are composed of drugs capable of promoting microbial resistance, therefore it need to be treated before being discharged into environmental soil, and use microalgae appears as a sustainable alternative, as these microorganisms have capacity to absorb accumulated organic matter. Thus, this study aimed to grow the microalgae *Chlorella minutissima* in presence of antimicrobial drugs under controlled conditions to prevent contamination of the cultivation by fungi and bacteria, aiming at the production of biomass under Taguchi method. Three test experiments were carried out: two in L<sub>4</sub> orthogonal arrangements to assess the influence of different carbon sources on biomass production and to measure the efficiency in inhibiting bacteria in cultivation by means of antibiotics, and one in L<sub>8</sub> orthogonal arrangement to check total inhibition of contaminating fungi in cultivation. The first experiment indicated that aeration and honey contributed to increase in chlorophyll *a* production. In the second experiment, growth of microalgae was independent of the experimental conditions. However, in the third experiment, cultivation in presence of the antibiotic Ceftriaxone promoted contamination of the culture medium by fungi. Therefore, tests were performed with addition of antifungals. The only antifungal that did not interfere with the color of culture when interacted with the antibiotic Ceftriaxone was Fluconazole. Therefore, an experiment was carried out to evaluate the cultivation of *C. minutissima* in presence of this drug, which indicated that microalgae used glucose as a source organic carbon. The highest concentrations of chlorophyll *a* and *b* were, respectively, 9.43 mg.L<sup>-1</sup> and 13.34 mg.L<sup>-1</sup>. CO<sub>2</sub> sources contributed to largest biomass burns (81.75% and 78.98%) during thermogravimetric analysis, a fact that is related to loss of moisture and thermal degradation of the product. ANOVA indicated that lighting, Fluconazole and Glucose are relevant with  $F_{\text{calc}} \geq 2$  to produce chlorophyll *a*. In view of these results, it could be concluded that the Taguchi method helped to better adjust the response variables, indicating that drugs used, in addition to inhibiting contamination of the culture medium, provide biomass production.

**KEYWORDS:** Antibiotics. Antifungals. Design of experiments. Taguchi. Biomass.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Gráfico comparativo das palavras-chave “ <i>microalgae</i> ” e “ <i>antibiotic</i> ” de publicações por ano. ....	27
Figura 2 - Gráfico comparativo das palavras-chave “ <i>microalgae</i> ” e “ <i>DOE</i> ” de artigos publicados por ano. ....	27
Figura 3 - Países que mais publicaram artigos com as palavras-chave “ <i>microalgae</i> ” e “ <i>DOE</i> ”. .....	28
Figura 4 - Palavras-chave mais utilizadas em relação aos termos “ <i>Wastewater</i> ” e “ <i>Taguchi</i> ”. .....	29
Figura 5 - Classificação da pesquisa. ....	30
Figura 6 - Fluxograma das principais etapas a serem desenvolvidas na pesquisa (etapa experimental). ....	30
Figura 7 - Fotomicrografia da microalga <i>C. minutissima</i> (40×). ....	32
Figura 8 - Estrutura da clorofila <i>a</i> e da clorofila <i>b</i> . ....	33
Figura 9 - Ilustração esquemática da estação de tratamento de esgoto instalada no Campus Araras da UFSCar. ....	37
Figura 10 - Rotas de contaminação dos fármacos. ....	38
Figura 11 - Fluxograma de extração de óleos a partir de biomassa microalgal. ....	43
Figura 12 - Amostras de suspensão celular e solução salina (NaCl) 30%. ....	48
Figura 13 - Espectro de varredura UV vis (400 a 1000 nm) da suspensão de células da microalga <i>C. minutissima</i> . ....	49
Figura 14 - Curva padrão do crescimento celular da microalga <i>C. minutissima</i> . ....	50
Figura 15 - Curva padrão de açúcares redutores (AR) em g.L <sup>-1</sup> . ....	52
Figura 16 - Amostras dos experimentos submetidas em banho ultrassom. ....	54
Figura 17 - Matriz experimental L <sub>4</sub> de Taguchi com quatro réplicas. ....	56
Figura 18 - Pseudo-hifas de fungos contaminantes (100×). ....	58
Figura 19 - Gráficos lineares de Taguchi para a matriz experimental L <sub>8</sub> . ....	60
Figura 20 - Curva de crescimento celular referente às 4 condições de cultivo testadas. ....	63
Figura 21 - Efeito dos fatores sobre a média. ....	63
Figura 22 - (a) Sistema de fotobiorreatores e (b) Efeito dos fatores sobre a média da produção de clorofila <i>a</i> . ....	65
Figura 23 - Perfil de crescimento da microalga <i>C. minutissima</i> . ....	67
Figura 24 - Fatores decodificados, pH dos cultivos e biomassa final. ....	68

Figura 25 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob a produção de biomassa. .....	68
Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Varredura (10.000K×) das células da microalga <i>C. minutissima</i> nas diferentes condições de cultivo. ....	69
Figura 27 - Perfil da concentração de clorofila <i>a</i> e de clorofila <i>b</i> após 15 dias de cultivo.....	70
Figura 28 - Alteração na coloração dos cultivos nos fotobiorreatores. ....	71
Figura 29 - Curva de crescimento celular de cultivos contendo diferentes fármacos. ....	72
Figura 30 - Curva de crescimento celular dos cultivos contendo o antifúngico Fluconazol....	73
Figura 31 - Produção celular e taxa de crescimento da microalga <i>C. minutissima</i> durante a fase de crescimento exponencial dos Experimentos 1 a 8.....	74
Figura 32 - Sistema de fotobiorreatores em duplicata.....	75
Figura 33 - Tubos de ensaio com teste de DNS e curva de consumo de açúcares redutores (AR) em cada experimento.....	76
Figura 34 - Experimentos ao final do cultivo (15° dia) (a) e tubos de ensaio após o tempo de extração de clorofila (b).....	77
Figura 35 - Biomassa dos experimentos em processo de floculação (a) e tempo de floculação total da biomassa (b).....	79
Figura 36 - Processo de filtração e de secagem de biomassa: (a) filtração a vácuo, (b) Biomassa úmida, (c) Biomassa em processo de secagem, (d) Biomassa seca e (e) Biomassa recuperada no processo de raspagem do filtro. ....	80
Figura 37 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 2. ....	82
Figura 38 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 8. ....	83
Figura 39 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob o crescimento celular. .	84
Figura 40 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob a produção celular.....	85
Figura 41 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob o tempo de floculação da biomassa. ....	87
Figura 42 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob a produção de clorofila <i>a</i> . .....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxas de ocorrências das palavras-chave envolvidas na pesquisa. ....	25
Tabela 2 - Composição do meio de cultivo F/2.....	47
Tabela 3 – Matriz experimental codificada. ....	56
Tabela 4 - Matriz experimental com seus respectivos níveis e fatores. ....	57
Tabela 5 - Arranjo ortogonal L <sub>4</sub> Taguchi.....	58
Tabela 6 - Concentração dos fatores Fluconazol (antifúngico), mel, glicose e sacarose. ....	59
Tabela 7 - Parâmetros de controle e níveis usados para selecionar as variáveis significativas no cultivo da microalga <i>C. minutissima</i> . ....	60
Tabela 8 - Arranjo ortogonal L <sub>4</sub> decodificado.....	62
Tabela 9 - ANOVA referente à produção de biomassa em relação à média. ....	64
Tabela 10 - Matriz L <sub>4</sub> de Taguchi com as variáveis codificadas, decodificadas, e variável resposta. ....	65
Tabela 11 - ANOVA referente à produção de clorofila <i>a</i> em relação à média. ....	65
Tabela 12 - Concentração de biomassa, clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i> no 15° dia de cultivo. ....	77
Tabela 13 - Concentração de biomassa em peso seco obtida em cada experimento.....	81
Tabela 14 - Matriz L <sub>8</sub> com as variáveis decodificadas e resultado do crescimento celular ao final do período de cultivo.....	84
Tabela 15 - Análises de variância do crescimento celular em relação à média e à razão S/N. ....	85
Tabela 16 - Matriz L <sub>8</sub> com as variáveis decodificadas e resultado do tempo de floculação da biomassa dos cultivos. ....	86
Tabela 17 - Análises de variância do tempo de floculação da biomassa microalgal em relação à média e à razão S/N. ....	87
Tabela 18 - Matriz L <sub>8</sub> com as variáveis decodificadas e resultado da concentração de clorofila <i>a</i> ao final do período de cultivo. ....	88
Tabela 19 - Análises de variância da produção de clorofila <i>a</i> em relação à média e à razão S/N.....	89
Tabela 20 - Parâmetros cinéticos do Experimento 1. ....	107
Tabela 21 - Parâmetros cinéticos do Experimento 2. ....	108
Tabela 22 - Parâmetros cinéticos do Experimento 3. ....	109
Tabela 23 - Parâmetros cinéticos do Experimento 4. ....	110
Tabela 24 - Parâmetros cinéticos do Experimento 5. ....	111
Tabela 25 - Parâmetros cinéticos do Experimento 6. ....	112

Tabela 26 - Parâmetros cinéticos do Experimento 7. ....	113
Tabela 27 - Parâmetros cinéticos do Experimento 8. ....	114
Tabela 28 - Parâmetros cinéticos do Experimento Controle. ....	115
Tabela 29 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 1. ....	116
Tabela 30 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 2. ....	117
Tabela 31 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 3. ....	118
Tabela 32 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 4. ....	119
Tabela 33 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 5. ....	120
Tabela 34 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 6. ....	121
Tabela 35 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 7. ....	122
Tabela 36 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 8. ....	123
Tabela 37 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento Controle. ....	124

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos de clorofila. ....	33
Quadro 2 - Reação dos antibióticos.....	38
Quadro 3 - Comparação das gerações de biocombustíveis. ....	41
Quadro 4 - Matriz experimental segundo o planejamento de Taguchi L <sub>8</sub> .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS: Absorvância  
Aer.: Aeração  
ANOVA: Análise de Variância  
AR: Açúcares Redutores  
ASTM: *American Society for Testing Materials*  
ATP: Trifosfato de adenosina  
Bor: Borbulhamento  
BQ: Biomassa queimada  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
DNS: Ácido 3-amino 5-nitrosalicílico  
DOE: *Design of Experiments*  
EDTI: Estação de Tratamento de Despejos Industriais  
Exp.: Experimento  
Fluc.: Fluconazol  
G: Geração  
Gli.: Glicose  
g: Grama  
Is: Isento  
kW: Quilowatt  
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura  
mg: Miligrama  
mL: Mililitro  
nm: Nanômetro  
pH: Potencial de hidrogênio  
RPM: Rotação por minuto  
S/N: *Signal of Noise*  
Sac.: Sacarose  
SQ: Soma Quadrada  
SMQ: Soma Média Quadrada  
T: Faixa de temperatura  
TG: Termogravimetria  
TGA: Análise Termogravimétrica

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\lambda_{\max}$ : Comprimento de onda máximo

$\Sigma$ : Somatória

$K$ : Tempo de duplicação

$\ln$ : Logaritmo neperiano

$n$ : Número de experimentos

$P$ : Produtividade

$r$ : Taxa de crescimento

$R^2$ : Coeficiente de determinação

$S^2$ : Variância

$X$ : Densidade celular

$Y$ : Valor da condição experimental

$\mu\text{mol}$ : Micro mol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1	DELIMITAÇÃO DA PESQUISA .....	22
1.2	OBJETIVO GERAL.....	22
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
1.3	JUSTIFICATIVA.....	23
<b>1.3.1</b>	<b>Análise bibliométrica</b> .....	23
<b>1.3.2</b>	<b>Classificação da pesquisa</b> .....	29
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	31
2.1	MICROALGAS.....	31
<b>2.1.1</b>	<b><i>Chlorella minutissima</i></b> .....	32
2.2	CLOROFILA.....	32
2.3	FONTES DE CO <sub>2</sub> ORGÂNICO EM CULTIVOS DE MICROALGAS .....	34
<b>2.3.1</b>	<b>Glicose</b> .....	34
<b>2.3.2</b>	<b>Sacarose</b> .....	35
<b>2.3.3</b>	<b>Mel</b> .....	35
2.4	TRATAMENTO DE EFLUENTES COM MICROALGAS .....	36
2.5	POLUENTES MAIS ABUNDANTES EM EFLUENTES FARMACÊUTICOS .....	37
<b>2.5.1</b>	<b>Antibiótico Ceftriaxona sódica</b> .....	39
<b>2.5.2</b>	<b>Antifúngico Fluconazol</b> .....	39
2.6	BIOCOMBUSTÍVEIS COM MICROALGAS .....	40
2.7	DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS (DOE).....	43
<b>2.7.1</b>	<b>Método de Taguchi</b> .....	44
<b>2.7.2</b>	<b>Razão Sinal/Ruído (S/N)</b> .....	45
2.7.2.1	Menor é melhor .....	45
2.7.2.2	Maior é melhor .....	45
2.7.2.3	Nominal é melhor.....	45
<b>2.7.3</b>	<b>Análise de Variância</b> .....	46
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
3.1	MICROORGANISMO.....	47
3.2	MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	47
3.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	48

3.3.1	<b>Determinação do peso seco</b> .....	48
3.3.2	<b>Construção da curva padrão</b> .....	49
3.4	<b>DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS</b> .....	50
3.4.1	<b>Produtividade</b> .....	50
3.4.2	<b>Taxa de crescimento</b> .....	51
3.4.3	<b>Tempo de duplicação</b> .....	51
3.5	<b>DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES</b> .....	52
3.5.1	<b>Solução padrão e determinação da curva padrão</b> .....	52
3.5.2	<b>Reagente DNS</b> .....	53
3.5.3	<b>Solução de Tartarato duplo de sódio e potássio</b> .....	53
3.6	<b>DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA</b> .....	53
3.7	<b>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARELURA (MEV)</b> .....	54
3.8	<b>OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL</b> .....	54
3.9	<b>ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)</b> .....	55
3.10	<b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES</b> .....	55
3.10.1	<b>Influência da luminosidade na produção de microalgas utilizando fontes de CO<sub>2</sub></b> .....	55
3.10.2	<b>Crescimento da microalga <i>C. minutissima</i> em presença de fármacos antimicrobianos</b> .....	57
3.10.2.1	Sulfametoxazol e Trimetoprima .....	57
3.10.2.2	Antibiótico: Ceftriaxona sódica.....	58
3.10.2.3	Antifúngicos: Fluconazol, Miconazol, Cetoconazol e Timidazol.....	58
3.11	<b>MÉTODOS ESTATÍSTICOS</b> .....	59
3.11.1	<b>Método de Taguchi</b> .....	59
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	62
4.1	<b>EXPERIMENTOS PRELIMINARES</b> .....	62
4.1.1	<b>Influência da luminosidade na produção de microalgas utilizando fontes de CO<sub>2</sub></b> .....	62
4.1.2	<b>Crescimento da microalga <i>C. minutissima</i> em presença de fármacos antimicrobianos</b> .....	66
4.1.2.1	Antibióticos Sulfametoxazol e Trimetoprima .....	66
4.3	<b>CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>C. minutissima</i> DE FLUCONAZOL</b> .....	72
4.3.1	<b>Perfil do crescimento celular</b> .....	72
4.3.2	<b>Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS</b> .....	75

<b>4.3.3</b>	<b>Determinação da concentração de clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i></b> .....	77
<b>4.3.4</b>	<b>Obtenção da biomassa</b> .....	78
<b>4.3.5</b>	<b>Comportamento da decomposição térmica (TGA)</b> .....	81
<b>4.3.6</b>	<b>Método de Taguchi</b> .....	83
4.3.6.1	Crescimento celular .....	83
4.3.6.2	Tempo de floculação da biomassa.....	86
4.3.6.3	Clorofila <i>a</i> .....	88
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	91
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	92
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	94
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE A - PARÂMETROS CINÉTICOS DE CADA UM DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS</b> .....	107
	<b>APÊNDICE B - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA BIOMASSA PRODUZIDA PELOS EXPERIMENTOS</b> .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

O mundo está enfrentando dificuldades em relação ao meio ambiente, e a disponibilidade de água e energia, a poluição da água, do ar e do solo e o aquecimento global, se destacam como os principais fatores impactantes. As atividades industriais estão crescendo cada vez mais, gerando resíduos e acabando com os recursos naturais (DAL MAGRO *et al.*, 2011).

Com o esgotamento das reservas de petróleo ligado ao aumento da busca global de energia refletindo a emissão de gases no efeito estufa, surge a necessidade de desenvolver fontes de energia renováveis que acarretem menos impactos ao meio ambiente e que tenham custos competitivos com as fontes de energia atuais. Perante isso, as indústrias buscam por fontes de energia mais limpas como a energia solar, térmica, hidrelétrica, eólica e de biocombustíveis (NETRAVALI & CHABBA, 2003; MUTANDA *et al.*, 2011; NEJAT *et al.*, 2015).

O uso de biocombustíveis é considerado útil para a geração de energia obtida por meio de biomassa (TOLMASQUIM, 2003). Os biocombustíveis são fontes de energia renováveis, nativas de produtos vegetais e animais, incluindo matéria orgânica morta não fossilizada, e causam menos danos ao meio ambiente em relação aos combustíveis provenientes do petróleo. Os gases gerados da queima de biocombustíveis são reabsorvidos pelas plantas e algas, mantendo um equilíbrio entre a emissão e absorção de gases poluentes (DEMIRBAS, 2009; SAMIMI & ZARINABADI, 2012; SILVA & KONRADT-MORAES, 2012).

Outro problema a ser considerado é o descarte de efluentes não tratados em solo ambiental, que pode ocasionar a eutrofização, um processo natural causado pelo acúmulo de nutrientes em corpos hídricos provenientes de atividades antrópicas (CARPENTER, 1998). Esse processo é considerado um problema para o meio ambiente, pois promove a degradação de *habitats* e perdas de biodiversidade (HOWARTH, 1998).

Os efluentes domésticos são compostos por 15% de antimicrobianos (SANTOS *et al.*, 2010). O uso destas substâncias na aquicultura está aumentando pois, se usados corretamente, previnem o crescimento de bactérias (MILIĆ *et al.*, 2013). Existe a necessidade de se obter uma fonte de energia renovável e tratar efluentes, e o uso de microalgas como matéria-prima surge como uma alternativa sustentável (CHISTI, 2008).

As microalgas são microrganismos procariontes ou eucariontes fotossintetizantes com composição química bastante diversificada como proteínas, lipídeos, carboidratos, etc. (BRENNAN & OWENDE, 2010). O cultivo de microalgas pode ser realizado em águas

residuárias, pois contém muitos nutrientes necessários para o seu crescimento, como fontes de carbono, fósforo e nitrogênio (CHINNASAMY *et al.*, 2010; CHO *et al.*, 2011). Algumas substâncias, como determinados antibióticos, podem afetar o desenvolvimento celular (LOURENÇO, 2006), assim como fontes de carbono orgânicas colaboram com a redução de perda de biomassa durante o período noturno (TORZILLO *et al.*, 1991), no qual a respiração celular supre o processo de energia do microrganismo (ANDRADE & COSTA, 2008).

As fontes de carbono orgânicas utilizadas como suplemento para os cultivos de microalgas são provenientes da adição de matérias-primas como açúcares, melão e até mesmo o mel, que é constituído por mais de 50% de açúcares e também de atividade antimicrobiana, fato que permite a redução da contaminação do meio de cultivo por organismos indesejáveis (ANDRADE & COSTA, 2008). Alguns autores utilizaram o melão como fonte de carbono no cultivo de microalgas (LEE & KYUN KIM, 2001; LAZARIDOU *et al.*, 2002; ANDRADE & COSTA, 2008), porém não há registros atuais de pesquisas utilizando essa substância como suplemento para cultivos heterotróficos de microalgas.

Quando aplicado na área de produção de biomassa a partir de microalgas, o método de Taguchi possibilita a melhoria do desempenho dos processos e redução da variabilidade. Esta técnica tem sido muito utilizada para planejar experimentos e conta com a estatística como ferramenta para análise de dados. Além disso, permite o ajuste das condições experimentais e avaliação dos efeitos que os fatores/variáveis têm sobre as respostas de interesse (FAROOQ *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2011).

Portanto, com o intuito de diminuir os impactos ambientais causados pela eutrofização e pelos combustíveis fósseis, este estudo tem como objetivo aferir o potencial biotecnológico da microalga *Chlorella minutissima*, avaliando os principais fatores de cultivo em meio de cultivo contendo fármacos antimicrobianos com fontes de carbono orgânico, a fim de reduzir a matéria orgânica acumulada neste meio, oferecendo um destino apropriado para esses resíduos líquidos e otimizando o processo de cultivo com métodos estatísticos.

## 1.1 DELIMITAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa em questão limita-se em realizar testes laboratoriais e estatísticos envolvendo o cultivo da microalga *C. minutissima* em fotobiorreatores tubulares (fechados). Foram realizados testes para verificar o rendimento de biomassa produzida em  $\text{mg.L}^{-1}$  e em biomassa seca, produção de clorofila e consumo de açúcares.

Os testes estatísticos foram realizados com o método de Taguchi, razão sinal ruído (S/N) e ANOVA. Estas técnicas permitiram a análise das melhores condições de ajuste do processo de produção de biomassa microalgal. Existem muitas barreiras que precisam ser superadas quando o objetivo é a produção de microalgas para fins energéticos. Os métodos descritos neste trabalho são apenas alguns de vários. Muitas espécies de microalgas são utilizadas em estudos científicos a fim de melhorar a eficiência de produção de biomassa, como também para aplicações ambientais.

Os resultados obtidos a partir deste trabalho são válidos somente para as condições experimentais do cultivo da microalga *C. minutissima*, com o intuito de melhorar a produção celular em relação às variáveis respostas já citadas com meio de cultivo com acréscimo de antimicrobianos.

As questões de pesquisa foram as seguintes:

- A produção de microalgas cultivadas com o antifúngico Fluconazol tem rendimento em larga escala?
- O antifúngico Fluconazol previne a contaminação por fungos no cultivo de microalgas?
- O princípio ativo farmacêutico (antifúngico Fluconazol) tem ação inibitória no crescimento da microalga?
- O método de Taguchi auxilia na identificação do melhor ajuste das variáveis respostas e dos principais fatores influentes no cultivo?

## 1.2 OBJETIVO GERAL

- Cultivar a microalga *C. minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos.

### 1.2.1 Objetivos específicos

- Cultivar a microalga *C. minutissima* em fotobiorreatores fechados sob condições controladas;
- Prevenir a contaminação do meio de cultivo por microrganismos indesejáveis;
- Obter biomassa de microalgas;
- Propor a melhor condição do processo de cultivo da microalga em presença de fármacos antimicrobianos pelo método de Genichi Taguchi.

## 1.3 JUSTIFICATIVA

A justificativa desta pesquisa consiste em complementar os trabalhos publicados na literatura referindo-se à integração de técnicas estatísticas aplicadas à Engenharia da Sustentabilidade com destaque no cultivo da microalga *C. minutissima*.

Tendo em vista a necessidade de realizar o tratamento de águas residuais contaminadas por antibióticos, o presente trabalho visa estudar a eficiência do cultivo de microalgas em presença de antibióticos e fontes de carbono orgânico na tentativa de prevenir a contaminação do meio por organismos indesejáveis e identificar as melhores condições de cultivo para produzir biomassa em larga escala.

### 1.3.1 Análise bibliométrica

A evolução da produção científica pode ser observada por meio da análise de dados bibliométricos, relacionando todas as áreas do conhecimento e conferindo a qualidade dos documentos publicados ao longo dos anos. Com isso, torna-se possível observar as mudanças nas subáreas do conhecimento e até mesmo em contextos específicos (WITTER, 1999).

As bases de dados internacionais permitem que os pesquisadores tenham acesso rápido e fácil a artigos científicos, monografias, dissertações, teses, normas técnicas, patentes, livros, estudos de caso, relatórios, ensaios, entre outros documentos originados de várias regiões do mundo (SILVA *et al.*, 2014).

Existem diferentes bases de dados, cada uma abrangendo temas específicos ou multidisciplinares. Entre as que mais compreendem assuntos relevantes para este estudo estão a SciELO, Web Of Science, Science Direct e Scopus, as quais são todas descritas por Silva *et al.* (2014).

A SciELO - Scientific Electronic Library Online (<http://www.scielo.org/php/index.php>), permite o acesso a mais de 544 periódicos de acesso gratuito na internet publicados no Brasil, Portugal, Chile, Peru, Argentina, Cuba, Espanha, México, Costa Rica, Venezuela, Colômbia e Uruguai. Esta compreende documentos das áreas de Ciências Biológicas, Ciências Exatas e da Terra, Engenharias, Ciências da Saúde, Ciências Agrárias, Ciências Sociais Aplicadas, Ciências Humanas, Letras e Artes.

A Web Of Science (<https://www.webofknowledge.com>) é uma base de dados organizada e administrada pela Thomson Reuters, empresa considerada uma das maiores do mundo no setor de jornalismo e que atua em vários segmentos deste ramo. A Web Of Science é considerada um dos mais tradicionais bancos de dados de pesquisas por artigos científicos.

Na base de dados Science Direct (<https://www.sciencedirect.com>) são disponibilizados 2558 periódicos da Elsevier e de outras editoras científicas que abordam as Áreas de Ciências Biológicas, Ciências Exatas e da Terra, Engenharias, Ciências da Saúde, Ciências Sociais Aplicadas, Ciências Humanas, Ciências Agrárias, Letras e Artes. Este varia a partir do ano 1993 e, além de não ser gratuito, os pesquisadores precisam ter cadastro ou pertencerem à alguma instituição financiadora para poderem acessar a plataforma.

A base de dados Scopus (<https://www.scopus.com>) disponibiliza periódicos relacionando o meio ambiente com outros variados assuntos na área da saúde, tecnologia, agricultura, educação e direito. A maior parte dos tópicos tem início na década de 1990, com conteúdo incluído desde 1948.

A Scopus é a maior base de dados de referências, resumos de literatura e de fontes de alta qualidade na internet. Apesar de abranger diversos conteúdos multidisciplinares, seu acervo inclui mais de 4300 documentos nas áreas de ciências da vida e mais de 6800 na área de ciências da saúde. Esta plataforma oferece opções de busca por filtro como: a busca por autor e filiação deste, assim como a busca simples por palavras chave e frases.

A Scopus diferencia-se das outras bases de dados por estar atualizada com a tecnologia e sua integração com outros produtos chave da Elsevier, como a Science Direct e Scirus, fato que procura diminuir os trabalhos de busca da informação e precipitar o avanço das pesquisas dos pesquisadores.

As plataformas Science Direct e Scopus são dois portais da Elsevier muito utilizados por quase todos os pesquisadores por abranger conteúdo multidisciplinar. Estas, oferecem excelentes meios de pesquisas de documentos nas principais revistas científicas, permitindo arquivar buscas personalizadas e fazer listas de autores, temas e instituições.

A Scopus possui uma ferramenta de análise e comparação entre a importância de uma ou várias revistas ao longo dos anos, além de filtrar os resultados por várias categorias, o que na Science Direct somente é disponibilizado por tema, título, tipo de documento e ano.

Nesse contexto, foram utilizadas as bases de dados Scopus, Web Of Science (WOS), SciELO e Science Direct (SD) para analisar a importância do presente estudo. Na Tabela 1, observa-se uma análise bibliométrica realizada nas bases de dados citadas, onde combinaram-se as palavras-chave na área da pesquisa desenvolvida.

Tabela 1 - Taxas de ocorrências das palavras-chave envolvidas na pesquisa.

(continua)

<b>Palavras-chave</b>	<b>Scopus</b>	<b>WOS</b>	<b>SciELO</b>	<b>SD</b>
<i>Microalgae × Biodiesel</i>	3324	5269	45	6898
<i>Microalgae × Wastewater</i>	2914	2630	47	8820
<i>Bioremediation × Antibiotic</i>	1254	399	3	3867
<i>Microalgae × Antibiotic</i>	301	243	3	3193
<i>Bioremediation × Microalgae</i>	854	467	15	2011
<i>Bioremediation × Pharmaceutical wastewater</i>	48	91	1	2214
<i>Fluconazole × Ceftriaxone</i>	7	32	0	1900
<i>Microalgae × DOE</i>	482	462	0	735
<i>Microalgae × Aluminum Sulfate</i>	49	38	1	1413
<i>Microalgae × Antifungal</i>	82	72	2	818
<i>Microalgae × Antibiotic × Biodiesel</i>	8	15	0	530
<i>Bioremediation × Microalgae × Pharmaceutical wastewater</i>	3	18	1	476
<i>Chlorella minutissima × Biodiesel</i>	41	62	2	353
<i>Microalgae × Taguchi Method</i>	8	12	0	307
<i>Microalgae × Honey</i>	4	4	0	200
<i>Chlorella minutissima × Antibiotic</i>	4	3	0	87
<i>Chlorella minutissima × Aluminum Sulfate</i>	0	1	0	73

Tabela 1 - Taxas de ocorrências das palavras-chave envolvidas na pesquisa.

(conclusão)

Palavras-chave	Scopus	WOS	SciELO	SD
<i>Microalgae</i> × <i>Fluconazole</i>	4	2	0	45
<i>Bioremediation</i> × <i>Chlorella minutissima</i> × <i>Pharmaceutical wastewater</i>	0	0	0	48
<i>Pharmaceutical wastewater</i> × <i>Microalgae</i> × <i>Taguchi Method</i>	0	0	0	35
<i>Chlorella minutissima</i> × <i>DOE</i>	0	1	0	24
<i>Microalgae</i> × <i>Ceftriaxone</i>	1	2	0	14
<i>Chlorella minutissima</i> × <i>Taguchi Method</i>	1	1	0	11
<i>Chlorella minutissima</i> × <i>Honey</i>	1	0	0	1
<i>Biorremediation</i> × <i>Chlorella minutissima</i>	1	0	0	0
<i>Chlorella minutissima</i> × <i>Ceftriaxone</i>	0	0	0	0
<i>Chlorella minutissima</i> × <i>Fluconazole</i>	0	0	0	0
<i>Chlorella minutissima</i> × <i>Fluconazol</i> × <i>Ceftriaxone</i>	0	0	0	0
<i>Microalgae</i> × <i>Fluconazol</i> × <i>Ceftriaxone</i>	0	0	0	0
<i>Microalgae</i> × <i>Miconozole</i>	0	0	0	0
<i>Microalgae</i> × <i>Ketoconazole</i>	0	0	0	0
<i>Microalgae</i> × <i>Thymidazole</i>	0	0	0	0

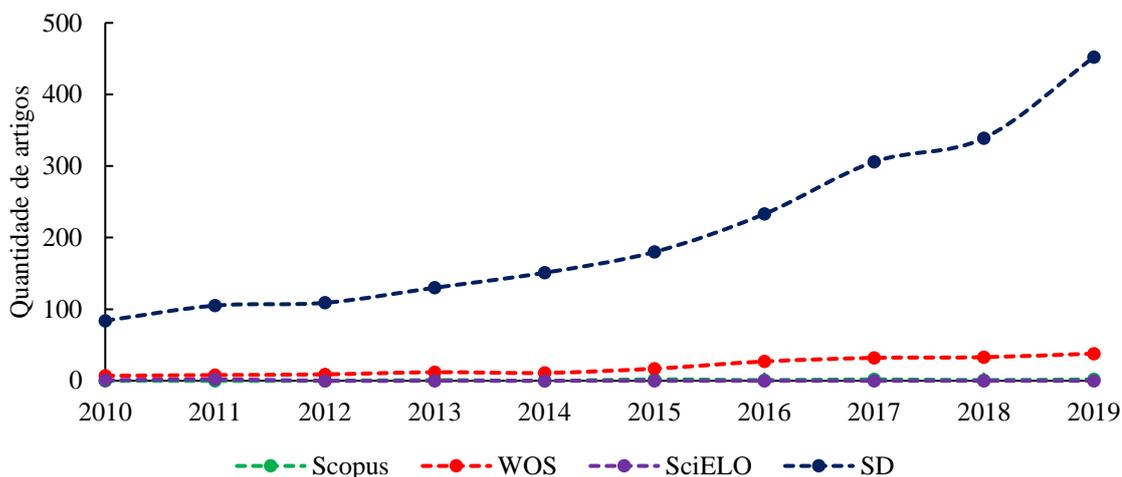
Fonte: Scopus e Web Of Science, SciELO e Science Direct (2020).

Observa-se que foram encontradas apenas sete publicações utilizando microalgas envolvendo os seguintes temas: Microalgas, Antibiótico e Biodiesel; e no que diz respeito à microalga *C. minutissima*, foram encontradas apenas seis publicações nos temas: DOE e Taguchi. Com base no que foi aludido, esta pesquisa releva a importância do uso de tais ferramentas para melhorar a qualidade do processo em questão.

Combinando as palavras-chave “*microalgae*” e “*antibiotic*” nas bases de dados Scopus e Web Of Science (WOS), SciELO e Science Direct (SD), foram encontrados, em média, cerca de 1380 publicações sobre o tema entre os anos de 2010 e 2019. E, ao comparar as palavras-chave “*microalgae*” e “*DOE*”, foram encontrados, em média, cerca de 419 documentos. Porém, ao combinar essas mesmas palavras-chave com o termo “*antibiotic*”,

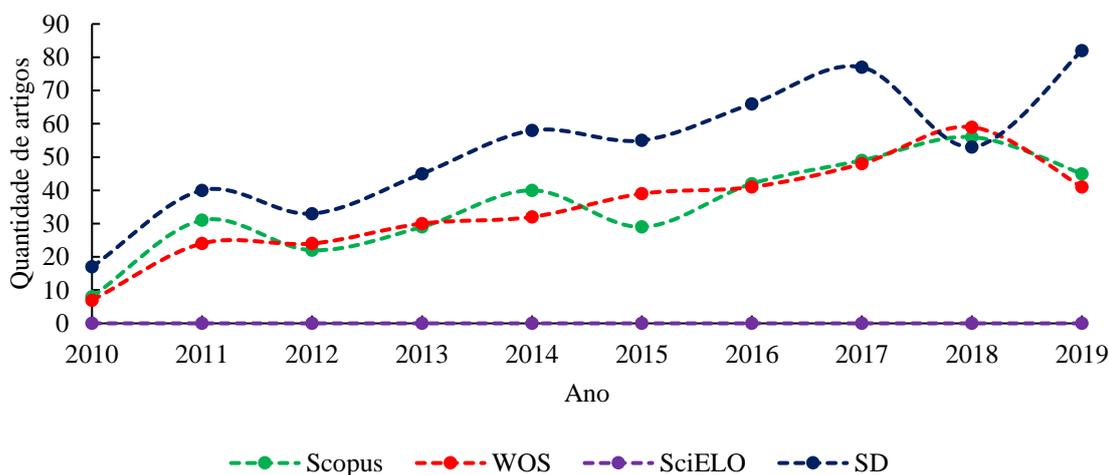
foram encontrados apenas 7 artigos publicados entre os anos de 2010 e 2019. Os gráficos são ilustrados, respectivamente, nas Figura 1 e na Figura 2.

Figura 1 - Gráfico comparativo das palavras-chave “*microalgae*” e “*antibiotic*” de publicações por ano.



Fonte: Scopus e Web Of Science, SciELO e Science Direct (2020).

Figura 2 - Gráfico comparativo das palavras-chave “*microalgae*” e “*DOE*” de artigos publicados por ano.

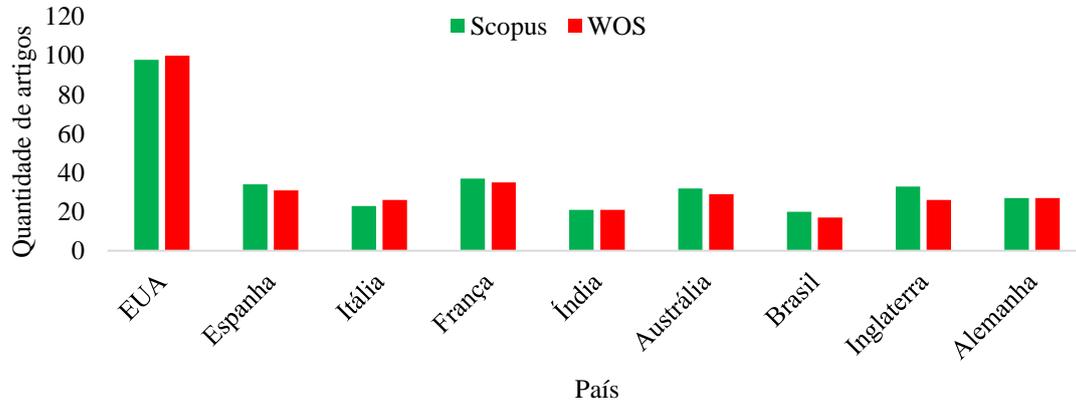


Fonte: Scopus e Web Of Science, SciELO e Science Direct (2020).

Nota-se ainda que a busca dos termos não gerou muitos resultados na base de dados SciELO, fato explicado por esta compor apenas documentos publicados no Brasil, Portugal, Chile, Peru, Argentina, Cuba, Espanha, México, Costa Rica, Venezuela, Colômbia e Uruguai (SILVA *et al.*, 2014).

Os países que mais publicaram artigos com palavras-chave “*microalgae*”, “*DOE*” e “*biodiesel*” durante os anos de 2010 e 2020 podem ser observados na Figura 3.

Figura 3 - Países que mais publicaram artigos com as palavras-chave “*microalgae*” e “*DOE*”.



Fonte: Scopus e Web Of Science, SciELO e Science Direct (2020).

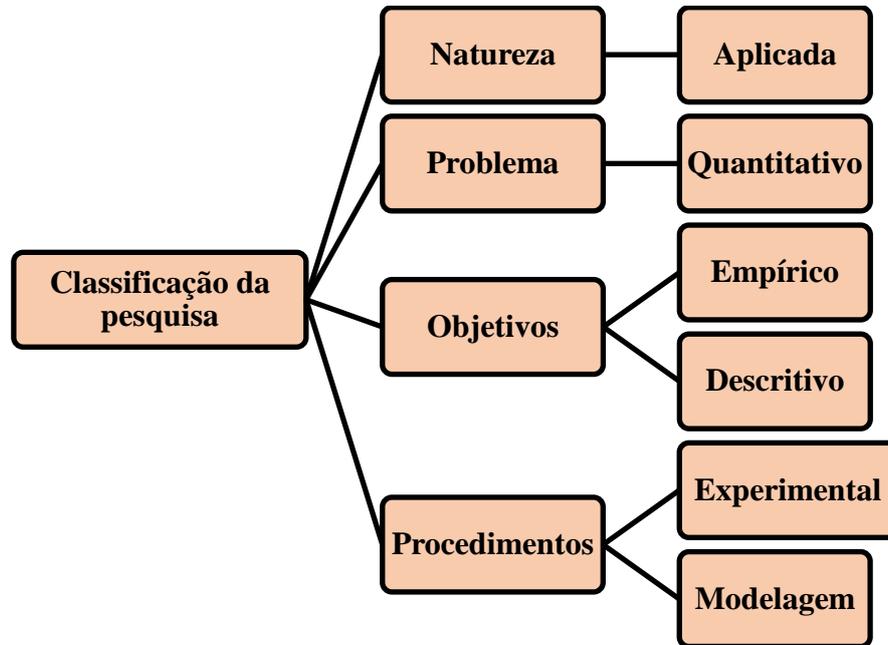
Neste gráfico, são mostrados dados somente das bases de dados Scopus e Web Of Science pois, os termos pesquisados não mostraram resultados na base de dados SciELO e, a base de dados Science Direct (SD) não consta no gráfico pelo fato de esta base não disponibilizar o refinamento de dados para países (SILVA *et al.*, 2014).

Com auxílio do software VOSviewer, foi possível mapear as palavras-chave mais utilizadas em pesquisas que utilizam os termos “*Wastewater*” (“Efluente”, em português) e “*Taguchi*”, observadas na Figura 4.



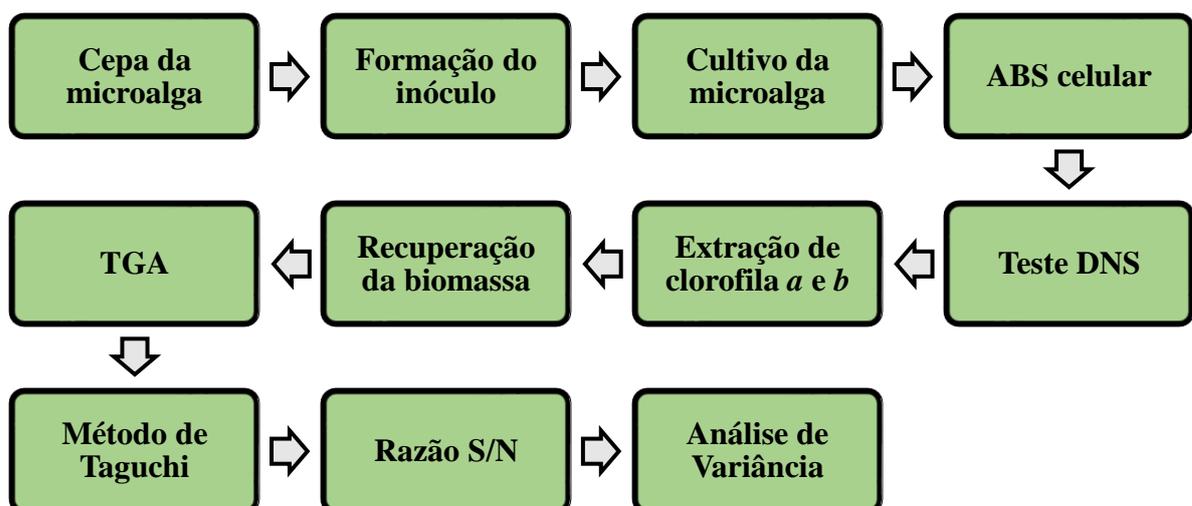
Pode-se observar na Figura 5, de forma resumida, a classificação desta pesquisa e, na Figura 6, um fluxograma das principais etapas a serem desenvolvidas durante a fase experimental da pesquisa.

Figura 5 - Classificação da pesquisa.



Fonte: Autora.

Figura 6 - Fluxograma das principais etapas a serem desenvolvidas na pesquisa (etapa experimental).



Fonte: Autora.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MICROALGAS

As microalgas são organismos autotróficos, classificados como procariotos ou eucariotos, e são encontradas em ambientes marinhos e de água doce. Compõem a comunidade fitoplanctônica e sua estrutura celular permite que convertam, por meio da fotossíntese, o dióxido de carbono atmosférico em uma grande variedade de metabólitos e produtos químicos como: proteínas, hidrogênio e lipídeos (BRENNAN & OWENDE, 2010; TAN *et al.*, 2015; NASCIMENTO, 2016).

Os principais sistemas utilizados para o cultivo de microalgas são classificados como: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. O cultivo autotrófico utiliza a luz como fonte de carbono por meio do processo de fotossíntese, e o heterotrófico faz uso apenas de matéria orgânica dissolvida como fonte de energia e de carbono. Por sua vez, o sistema mixotrófico é misto de duas etapas, a primeira em cultivo autotrófico e a segunda em cultivo heterotrófico, consentindo crescer a produção de biomassa (BRENNAN & OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010).

Segundo Dominguez (2013), esses microrganismos estão sendo mundialmente utilizados em diferentes aplicações como na indústria farmacêutica, nutrição humana e animal, cosméticos, produção de bioenergia e até mesmo para o tratamento de águas residuais.

Além dos nutrientes do meio de cultura, para ter um crescimento adequado das microalgas é necessária uma fonte luminosa que emita comprimentos de onda que auxiliem no processo da fotossíntese, afetando o crescimento e a composição dos ácidos graxos desses microrganismos (RA *et al.*, 2016). Pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de obter maior eficácia da fotossíntese, transformando a energia química em biomassa (BOLTON & HALL, 1991; CORNET *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 2008).

Portanto, a quantidade e qualidade de energia luminosa fornecida durante o cultivo de microalgas pode ser considerado um dos parâmetros mais importantes, por ser um fator insubstituível para o processo de fotossíntese e para regular diferentes processos no desenvolvimento das microalgas (SCHULZE *et al.*, 2016).

### 2.1.1 *Chlorella minutissima*

A espécie *Chlorella minutissima* (Figura 7) pode ser encontrada em ambientes marinhos e se caracteriza por ser uma microalga unicelular eucariótica com diâmetro entre 5-10 µm com parede celular bastante ortodoxa. Tem capacidade de converter a energia solar em energia química pelo processo de fotossíntese, que permite a produção de clorofila *a* e clorofila *b*, que equivale a quase 2% de seu peso seco e os lipídeos são os seus principais constituintes celulares. A *C. minutissima* faz uso do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), luminosidade, sais e água para se reproduzir e até mesmo para produzir energia (BECKER, 2004, COSTA *et al.*, 2009).

Figura 7 - Fotomicrografia da microalga *C. minutissima* (40×).



Fonte: Borghetti (2009).

## 2.2 CLOROFILA

A clorofila é um pigmento encontrado, principalmente, em plantas e algas, organismos que possuem compostos capazes de absorver radiação (ESTEVES, 1998). Existem quatro tipos de clorofila, os quais são destacados no Quadro 1 acoplado à suas respectivas funções.

Quadro 1 - Tipos de clorofila.

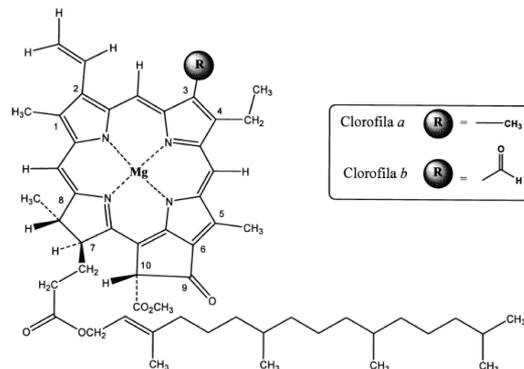
Tipo	Presente em	Função
Clorofila <i>a</i>	Plantas, algas e cianobactérias	Essencial para a fotossíntese, produz substâncias orgânicas
Clorofila <i>b</i>	Plantas, algas verdes e euglenoides	Pigmento acessório: absorve a luz e a transfere para a Clorofila <i>a</i>
Clorofila <i>c</i>	Algas pardas e diatomáceas	Pigmento acessório: substitui a Clorofila <i>b</i>
Clorofila <i>d</i>	Algas vermelhas	Pigmento acessório

Fonte: Santos (2019).

Todos os organismos fotossintetizantes possuem a clorofila *a*, um pigmento que tem a função de captar a energia luminosa, destacando-se o pigmento mais importante para o processo de fotossíntese (LOURENÇO, 2006).

Quando expostas em águas turbulentas, as microalgas são capazes de se adaptarem á altas e baixas concentrações de energia luminosa subaquática. O desenvolvimento em baixas intensidades de energia luminosa aumenta a concentração de clorofila na célula (TUNDISI, 2008).

Contudo, alguns fatores podem interferir na qualidade da clorofila produzida pelo organismo. Quando expostos em altas concentrações de energia luminosa, ocorre o processo de fotoinibição associada à taxa de fotodestruição ou oxidação dos pigmentos, definindo que a qualidade, a intensidade e a duração da irradiação na superfície aquática são fatores importantes para os organismos fitoplanctônicos (CALIJURI *et al.*, 2006). A estrutura química da clorofila *a* e clorofila *b* pode ser observada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura da clorofila *a* e da clorofila *b*.

Fonte: Streit *et al.* (2005).

Devido ao aspecto de cor verde, as clorofilas são bastante utilizadas em indústrias alimentícias e de cosméticos, servindo como corante para os produtos. Nas indústrias alimentícias, o uso da clorofila destaca-se, principalmente, na produção de bebidas, queijos, chocolate e biscoitos (VOLP, 2009).

O uso deste pigmento como corante natural faz com que a utilização de recursos sintéticos provindos do petróleo diminua (ROMERO-LOPEZ *et al.*, 2012). Além disso, as clorofilas são compostas de agentes terapêuticos, os quais protegem o DNA de radiações iônicas, como também atuam como agentes anticancerígenos e antimutagênicos (VOLP, 2009).

### 2.3 FONTES DE CO<sub>2</sub> ORGÂNICO EM CULTIVOS DE MICROALGAS

O carbono orgânico é um composto que beneficia o desenvolvimento das microalgas, além de oferecer fonte de energia a esses microrganismos. Normalmente, em cultivos heterotróficos e mixotróficos, pesquisadores fazem uso de sacarose, glicose, amido, entre outras fontes de carbono (CHEN *et al.*, 2011; DALIRY *et al.*, 2017; KIM, 2015).

A adição de fontes de carbono ao meio de cultivo é considerada um fator importante para o desenvolvimento das microalgas pois, dependendo da espécie, elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> podem inibir a produção de biomassa, enquanto que para outras espécies pode estimular o crescimento de células (DALIRY *et al.*, 2017).

#### 2.3.1 Glicose

A suplementação com glicose (10%) no meio de cultivo de microalgas estimula o acúmulo de células, o rendimento de lipídeos neutros e também a produção de ácidos graxos saturados ao invés de poli saturados e monossaturados (REN *et al.*, 2016).

Há muito tempo, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando glicose e outras fontes de carbono orgânico em cultivos de microalgas. Becker e Venkataraman (1984) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. com acréscimos de glicose, sucrose, manose, frutose e galactose, nos quais todos os experimentos tiveram crescimento de biomassa da microalga, embora o que continha glicose demonstrou ser a melhor fonte de carbono orgânica para a espécie de microalga em estudo.

A glicose colabora com a redução da perda de biomassa durante o período noturno (TORZILLO *et al.*, 1991), no qual a respiração celular supre o processo de energia do

microrganismo (ANDRADE & COSTA, 2008). Esta substância, quando utilizada como suplemento para os cultivos de microalgas, pode ser proveniente da adição de matérias-primas, como sacarose, meloço, mel ou até mesmo pura.

### 2.3.2 Sacarose

A sacarose compõe até 60% da biomassa seca de determinadas espécies vegetais como a cana de açúcar e a beterraba, além de poder ser utilizada como suplemento de fonte de carbono orgânico em cultivos de microalgas em processos de produção de óleos unicelulares (OLGUÍN *et al.* 2008).

Dissacarídeos como a sacarose são substratos oxidáveis, podendo ser utilizados como reservas energéticas para manter o nível de energia celular (ATP) durante o processo de respiração das células. Por este motivo, as células são capazes fazer uso deste substrato, adaptando-o para o desenvolvimento heterotrófico de microalgas (FRANCISCO *et al.*, 2014).

Cheng *et al.* (2009) estudaram o efeito da sacarose como fonte de carbono orgânico na produção de lipídios da microalga *Chlorella protothecoides* cultivada em sistema heterotrófico, descobrindo que o acréscimo de sacarose como fonte de carbono estimulou a produção do conteúdo lipídico da espécie de microalga estudada.

### 2.3.3 Mel

O mel é uma substância produzida por abelhas melíferas *Apis* sp. para servir como fonte de alimento às mesmas, e a principal matéria-prima é o néctar das flores. Este produto tem um alto valor nutricional, além de ser constituído por açúcares como d-frutose e d-glicose (SILVA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006).

Essa substância possui mais de 50% de açúcares, aferindo uma possível utilização como fonte de carbono para suplementar meios de cultivo de microalgas (LAZARIDOU *et al.*, 2002; LEE & KYUN KIM, 2001).

Alguns autores utilizaram o meloço como fonte de carbono no cultivo de microalgas (LEE & KYUN KIM, 2001; LAZARIDOU *et al.*, 2002; ANDRADE & COSTA, 2008), porém não há registros atuais de pesquisas utilizando essa substância como suplemento para cultivos heterotróficos de microalgas.

Um estudo com o mel produzido por abelhas comprovou atividade antibacteriana do produto, atuando na cicatrização de feridas e queimaduras, e até mesmo impedindo a entrada

de substâncias e perdas de fluido (ALVES *et al.*, 2008). Outra pesquisa mais recente indica que os méis Meliponini produzidos por abelhas da Costa Rica possuem grande atividade antibacteriana contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Além disso, o mel produzido pelas espécies de abelhas *T. angustula* e *M. beecheii* foram mais eficazes do que aquele produzido pela espécie *A. mellifera* (ZAMORA, 2018).

Andrade e Costa (2008) realizaram o cultivo da microalga *S. platensis* com a suplementação do meio de cultivo com melação líquido (MEL) e melação em pó (MEP) (33 dias), que resultou em maior produção de biomassa do que em cultivo autotrófico (30 dias). Porém, a velocidade de crescimento da microalga não se mostrou significativa em relação à concentração de MEL e MEP no meio de cultivo, indicando que a potencialidade que o Brasil tem em produzir melação pode ser aproveitada para obter-se biomassa a partir de microalgas.

#### 2.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM MICROALGAS

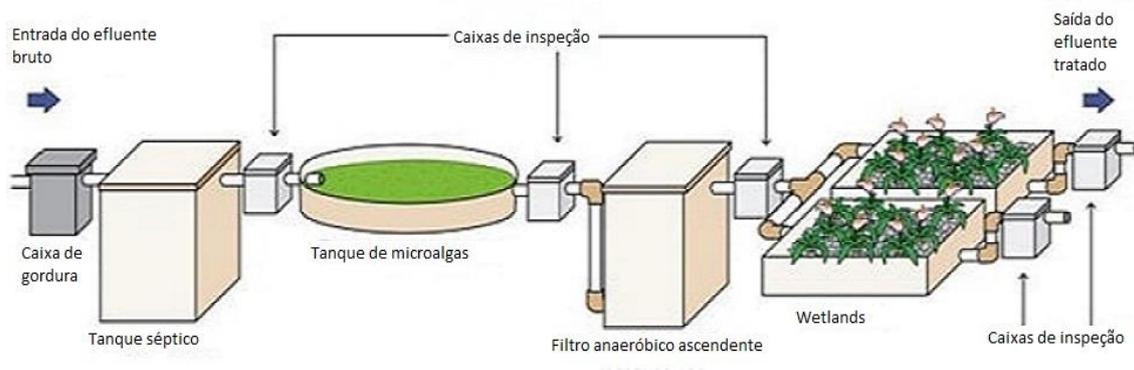
De acordo com Carpenter (1998), a biotecnologia das microalgas é bastante eficiente quando o assunto é o tratamento de efluentes; elas atuam nesses meios biorremediando metais pesados, nitrogênio e fósforo que, quando descartados em rios e lagos, podem causar a proliferação de matéria orgânica, ou seja, a eutrofização. Este é um processo natural, mas considerado um problema para o meio ambiente, pois promove a degradação de *habitats* e perdas de biodiversidade (HOWARTH, 1998).

Cultivar microalgas em águas residuárias permite o acesso a diferentes meios de cultivos, pois a composição orgânica e inorgânica dos efluentes varia de acordo com sua origem (DAL MAGRO *et al.*, 2011). Quando cultivadas com fonte de carbono orgânica inserida em seu meio de cultivo, ou seja, em meio mixotrófico, as microalgas conseguem atingir maior porcentagem de crescimento se comparadas às cultivadas em meio autotrófico, apresentando também, biomassa com composições diferentes (ORPEZ *et al.*, 2009; DICKNSON *et al.*, 2013; TUANTET *et al.*, 2014). Esta capacidade de absorver nutrientes permite que as microalgas sejam utilizadas no tratamento de efluentes domésticos e industriais, reduzindo a matéria orgânica do meio (ANDRADE & COSTA, 2008).

Souza *et al.* (2015) utilizou efluente doméstico com cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* adaptada em cultivo em efluente universitário. O efluente foi tratado pelas microalgas, obtendo 90% de eficiência na remoção da matéria orgânica contida no meio. Além disso, o efluente resultante foi classificado como adequado para a adubação do solo

cultivado com *Zantedeschia aethiopica*. O sistema utilizado neste estudo é demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Ilustração esquemática da estação de tratamento de esgoto instalada no Campus Araras da UFSCar.



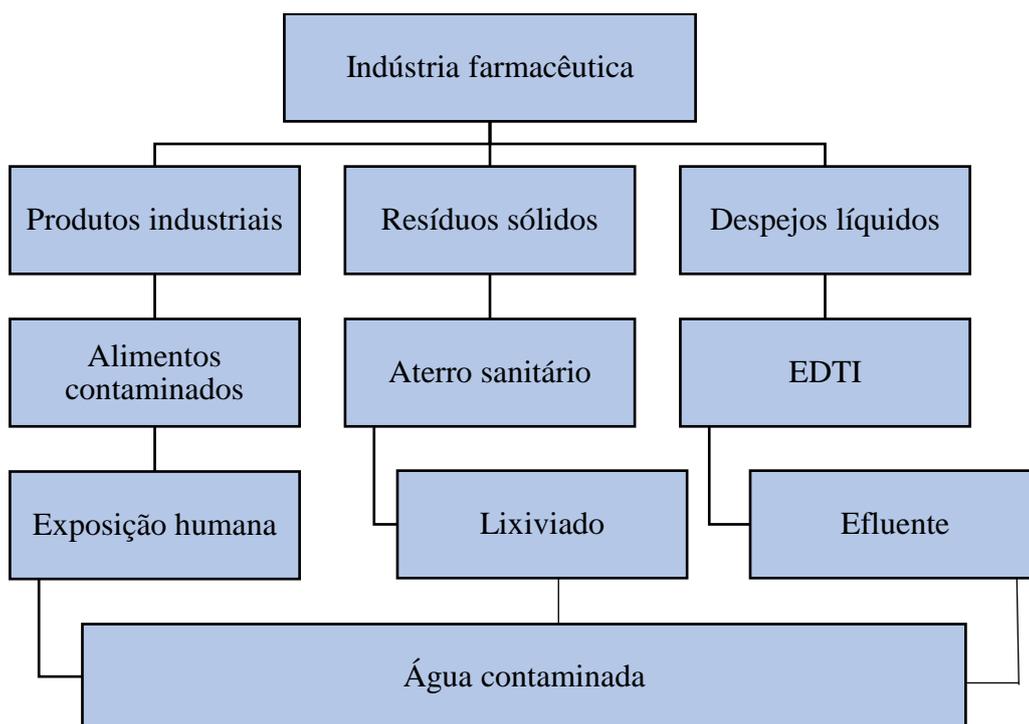
Fonte: Pulschen *et al.* (2013).

Estudos de Solimeno *et al.* (2015) afirmam que neste tipo de sistema de tratamento de efluente as microalgas ministram oxigênio para as bactérias aeróbias, que degradam outros constituintes dos efluentes, o que reduz mais ainda a carga poluidora do meio.

## 2.5 POLUENTES MAIS ABUNDANTES EM EFLUENTES FARMACÊUTICOS

Os fármacos estão entre os poluentes mais abundantes em ambientes aquáticos e ganham maior atenção por causa de sua competência de se conter no ambiente e também os danos que podem causar à biota (GHISELLI & JARDIM, 2004). A presença de antibióticos em rios e/ou lagos pode originar resistências bacterianas, além do impacto nesses ecossistemas e até na saúde humana (MILIĆ *et al.*, 2013). A Figura 10 ilustra, de forma resumida, as rotas feitas pelos efluentes provindos da indústria farmacêutica.

Figura 10 - Rotas de contaminação dos fármacos.



Fonte: Autora.

Artigos publicados entre 1997 e 2009 (cerca de 52% de 134 artigos) relatam que os fármacos mais abundantes em ambientes aquáticos são anti-inflamatórios não esteroides (16%), antibióticos (15%), reguladores lipídicos (12%) e hormônios sintéticos (9%) (SANTOS *et al.*, 2010).

Em pesquisa, Ríos Pinto (2014) adicionou concentrações dos antibióticos Cloranfenicol ( $10\text{mg.mL}^{-1}$ ), Kanamicina ( $10\text{mg.mL}^{-1}$ ), Carbenicilina ( $10\text{mg.mL}^{-1}$ ) e Amoxicilina ( $500\text{mg.mL}^{-1}$ ) ao meio de cultivo BG-11 a fim de avaliar a possibilidade de eliminar ou controlar o crescimento das bactérias presentes no cultivo da microalga *Desmodesmus* sp. Houve acréscimo de glicose ( $10\text{g.L}^{-1}$ ) como fonte de carbono. A reação dos antibióticos no cultivo da microalga pode ser observada no Quadro 2.

Quadro 2 - Reação dos antibióticos

Antibiótico	Observação
Cloranfenicol	Inibiu o crescimento da microalga
Kanamicina	Mostrou crescimento e diminuiu as bactérias
Carbenicilina	Crescimento de diferentes classes de bactérias
Amoxicilina	Não diminuíram as bactérias

Fonte: Ríos Pinto (2014).

O único antibiótico que não inibiu o crescimento da microalga estudada foi o Kanamicina ( $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Além disso, a microalga utilizou parte da glicose para seu crescimento, durante os 6 dias de cultivo.

Análises toxicológicas envolvendo microalgas expostas a antibióticos presentes no ambiente aquático são relevantes, pois os dados relativos à essas substâncias são importantes para uma avaliação global do impacto dos fármacos liberados no meio ambiente (FERREIRA *et al.*, 2007). Para uma melhor avaliação, é interessante realizar testes em outros organismos marinhos de ordem superior às microalgas, a fim de compreender melhor o impacto que os fármacos podem causar quando liberados em ambiente marinho. Análises do solo ou de sedimentos onde essas substâncias se acumulam também são indicadas (PRATA, 2016).

### **2.5.1 Antibiótico Ceftriaxona sódica**

O antibiótico Ceftriaxona sódica é um produto derivado de fermentação e de uso parental; classificado como uma cefalosporina semi-sintética de terceira geração, tem a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, fato de extrema importância, pois as gerações anteriores não possuem esta capacidade (GUIMARÃES *et al.*, 2010; TORTORA *et al.*, 2012; MANFIO *et al.*, 2013). Este fármaco atua tanto sob bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, entretanto, apresenta maior eficácia contra bactérias Gram-negativas (LOURENÇO *et al.*, 2013; MANFIO *et al.*, 2013; ALI; ELBASHIR; ABOUL-ENEIN, 2015).

Os métodos analíticos para determinação do teor de Ceftriaxona sódica não são ambientalmente eficazes e, devido à importância deste fármaco na indústria farmacêutica, pesquisas envolvendo métodos mais sustentáveis ao meio ambiente são requisitadas, a fim deste fármaco causar menos danos ao meio ambiente (SANTOS, 2005) e a absorção deste por microalgas pode ser uma das alternativas.

### **2.5.2 Antifúngico Fluconazol**

O Fluconazol é um antifúngico classificado como triazol bem tolerado (triazólico) que apresenta farmacocinética linear, permitindo que as concentrações plasmáticas aumentem quando se administra o fármaco. Serve para tratar infecções fúngicas sistêmicas específicas, podendo alcançar concentrações plasmáticas de até 80% após a administração do fármaco. Apresenta uma farmacocinética linear, permitindo maiores concentrações plasmáticas quando se incrementa a dose aplicada devido a sua alta biodisponibilidade (FICA, 2004).

Possui boa ação contra *Cryptococcus neoformans* e contra a maioria de *Candida* spp; porém existem algumas limitações de atividades do Fluconazol como a inibição de fungos filamentosos e resistência natural à algumas leveduras contra este fármaco (*C. krusei*) e a resistência adquirida por *Candida* e *C. neoformans* (COLOMBO, 2002; FICA, 2004).

## 2.6 BIOCOMBUSTÍVEIS COM MICROALGAS

Além de dar um destino apropriado para as águas de efluentes, as microalgas vêm sendo utilizadas na produção de biocombustíveis. Com a crescente demanda mundial por combustíveis, e a possibilidade de esgotar as fontes de petróleo, o mundo está enfrentando diversos problemas em relação ao aquecimento global e o aumento do preço do petróleo. Uma das alternativas de caráter sustentável é o cultivo de microalgas para produção de biomassa com acúmulo de óleo, que pode ser convertido em biodiesel (WANG & HUANG, 2007).

As microalgas são capazes de absorver CO<sub>2</sub> da atmosfera, reduzindo os gases do efeito estufa (SANI *et al.*, 2013) e por esse motivo, é aconselhável que o cultivo desses microrganismos seja feito próximo às empresas que produzam altas concentrações de CO<sub>2</sub> (GAZZONI, 2014). Estima-se que, aproximadamente 1,8 toneladas de CO<sub>2</sub> possa ser convertida em cerca de 1 tonelada de biomassa microalgal. É imprescindível grande oferta de CO<sub>2</sub> para a produção de biomassa em larga escala (GAZZONI, 2016).

A *American Society for Testing Materials* (ASTM; D6751, 2015) define biodiesel como um combustível sintético, proveniente de matéria-prima renovável e composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeias longas que são originados de óleos vegetais ou gordura animal. A produção de biocombustíveis derivados da biomassa microalgal é um processo que ocasiona menor impacto ambiental, pois seu cultivo não compete por espaço com a produção de alimentos, como os biocombustíveis obtidos a partir de outras matérias-primas (MIRANDA, 2011).

Existem quatro gerações de biocombustíveis, primeira (1G), segunda (2G), terceira (3G) e quarta (4G). Os biocombustíveis 1G são baseados em fermentar açúcares provenientes da cana-de-açúcar para obter etanol. Já os 2G são obtidos de açúcares extraídos de resíduos agroindustriais, como restos de madeira, palha e bagaço. Porém, as etapas de produção dos biocombustíveis 2G ainda têm custos não acessíveis e são dependentes de ajustes tecnológicos (GIBBS *et al.*, 2008).

Por sua vez, os biocombustíveis 3G são baseados na produção da biomassa obtida de microalgas. Esses sistemas são dependentes de recursos tecnológicos menos exigentes que os

sistemas 2G, pois possuem benefício de serem cultivados em espaços menores e têm menor custo de produção quando comparados com os processos de produção dos biocombustíveis 4G, que envolvem modificações genéticas nas espécies mais oleaginosas (MARQUES, 2013). Quadro 3 compara as quatro gerações citadas com produtos derivados do petróleo.

Quadro 3 - Comparação das gerações de biocombustíveis.

(continua)

<b>Fonte</b>	<b>Tecnologia</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Produto</b>	<b>Problema</b>	<b>Benefício</b>
<b>Fóssil</b>	Refinaria de petróleo	Petróleo bruto	Gasolina, nafta, diesel, querosene, combustível de aviação	Hidrocarbonetos liberam gases, esgotamento do petróleo, dificuldades econômicas e ecológicas	Alta eficiência energética; tecnologia desenvolvida; facilidade no transporte (líquido e gasoso)
<b>Biomassa de 1ª geração</b>	Fermentação microbiana e transesterificação química e enzimática	Óleo vegetal, milho, girassol, cana-de-açúcar	Biodiesel, etanol de cana-de-açúcar	Fontes limitadas (alimento × combustível) Mistura parcial com combustível	Ambientalmente correto; econômico e socialmente seguro
<b>Biomassa de 2ª geração</b>	Pré-tratamento, hidrólise e fermentação, transesterificação	Resíduos florestais, óleo residual, gordura animal	Bio-óleo, etanol, butanol e misturas de álcoois	A tecnologia não está totalmente pronta	Não compete por alimentos, tecnologia em desenvolvimento, ambientalmente e socialmente correta

Quadro 3 - Comparação das gerações de biocombustíveis.

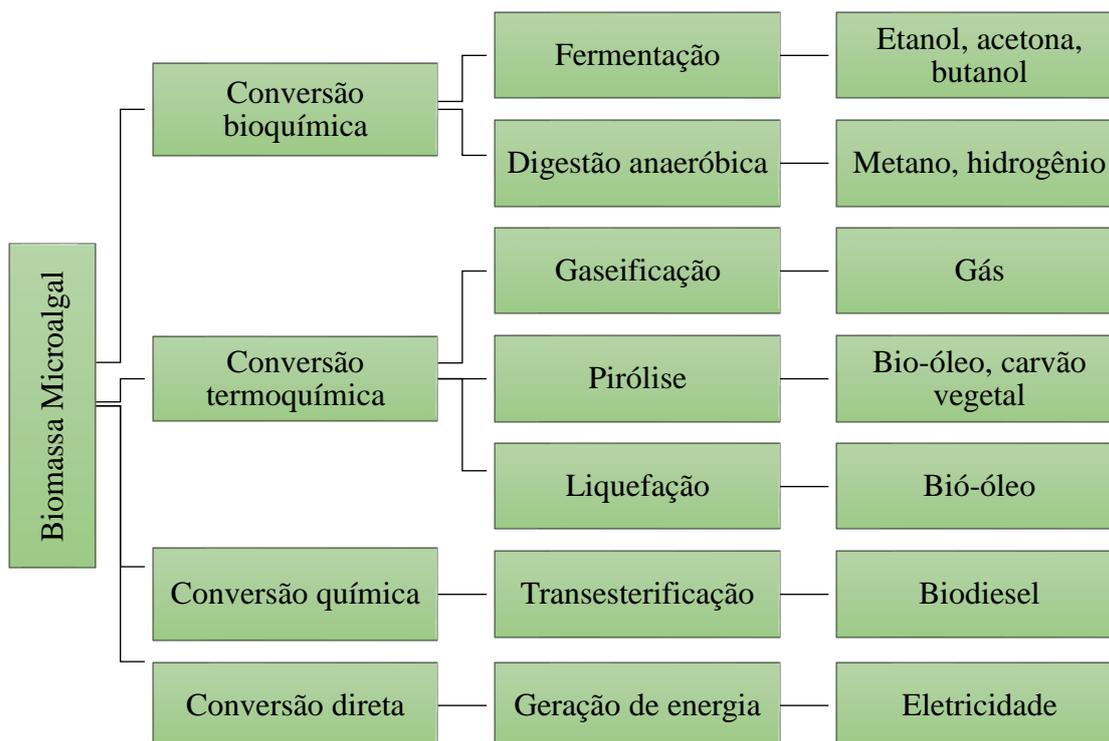
(conclusão)

Fonte	Tecnologia	Matéria-prima	Produto	Problema	Benefício
Biomassa de 3ª geração	Síntese direta, biomassa fraccionada	Algas, Microalgas, Cianobactérias	Biodiesel, bioetanol, biohidrogenio e biometano	Tecnologia em desenvolvimento e custos elevados	Não compete por alimentos, consumo de CO <sub>2</sub> , mais produtividade de óleo do que outras biomassas
Biomassa de 4ª geração	Modificação genética das espécies produtoras de óleo	Espécies produtoras de óleo	Biodiesel e bioetanol	Em desenvolvimento dos aspectos técnicos e econômicos	Biocombustível livre de CO <sub>2</sub> , segurança energética

Fonte: Adaptado de Suganya *et al.* (2016); Lü, Sheahan e Fu (2011).

Mas, assim como os óleos provenientes das plantas, o óleo de microalgas não pode ser utilizado diretamente como combustível, pois é composto por triglicerídeos, mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, entre outras impurezas (KHAN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010). Para que esse óleo seja usado como combustível, é necessário transformá-lo quimicamente por meio da transesterificação, processo que transforma os triglicerídeos em diglicerídeos, e depois em monoglicerídeos que são convertidos em ésteres e glicerol, e por fim, obtendo-se o biodiesel (MATA *et al.*, 2010). A Figura 11 ilustra os métodos utilizados para obtenção de lipídeos de acordo com o produto desejado a obter-se no final do processo.

Figura 11 - Fluxograma de extração de óleos a partir de biomassa microalgal.



Fonte: Adaptado de Brasil & Costa (2016).

Nessa perspectiva, estudos com ênfase em processos biológicos estão sendo desenvolvidos para o tratamento de águas residuais a partir de microrganismos capazes de absorver compostos tóxicos para o meio ambiente acumulados no efluente. Esse processo já é considerado uma tecnologia promissora em expansão (QUINTELAS *et al.*, 2008; MÓDENES *et al.*, 2009) e, com o planejamento de experimentos, já é possível avaliar os principais efeitos entre os fatores de um processo.

## 2.7 DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS (DOE)

O delineamento/planejamento experimental (DOE) é um método utilizado para determinar diferentes fatores de entrada e saída de um processo, envolvendo todo o conjunto de experimentos, onde todos os fatores significativos são variados ordenadamente (HARIDY *et al.*, 2011).

Este método consiste juntar critérios estatísticos e científicos, objetivando determinar a influência das variáveis de entrada selecionadas nas variáveis de resposta, possibilitando identificar as melhores condições experimentais e melhorar a qualidade de bens e serviços

com maior precisão estatística visando o menor custo (BUTTON, 2005; ARANDA, 2008; SILVA & SILVA, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

As etapas do DOE consistem em: (i) planejamento, (ii) execução dos experimentos, (iii) análise dos dados, (iv) experimentos de confirmação e (v) conclusão.

### 2.7.1 Método de Taguchi

O método criado por Genichi Taguchi permite investigar como a influência dos parâmetros afeta um dado processo (KISHORE *et al.*, 2009). Consiste em empregar uma matriz na qual a quantidade de colunas se refere ao número máximo de fatores a serem analisados (RANA *et al.*, 2014), permitindo uma avaliação estatística independente do efeito de cada fator e assim, analisar os dados coletados (TANSEL *et al.*, 2011). De forma geral, esse método é muito utilizado para fazer a otimização de processos e produtos (PANDEY & PANDA, 2015).

Para desenvolver a análise desse método, é necessário seguir as seguintes etapas: (i) seleção de variáveis independentes, (ii) seleção de números de configurações de nível para cada variável independente, (iii) seleção da matriz ortogonal, (iv) atribuição das variáveis independentes para cada coluna, (v) realização dos experimentos e (vi) análise dos dados obtidos (NELLIAN, 1996). O método de Taguchi é muito importante para a engenharia de qualidade por ser capaz de minimizar a função perda de qualidade e maximizar ou minimizar a relação sinal-ruído (S/N), definindo assim, as matrizes ortogonais (Vidal, 2014).

Loures (2016) utilizou o método de Taguchi para avaliar diferentes variáveis de entrada no cultivo da microalga *C. minutissima*, tais como CO<sub>2</sub> (%), NO<sub>3</sub> (g.L<sup>-1</sup>), PO<sub>4</sub> (g.L<sup>-1</sup>), suplementação (mL), temperatura (°C) e salinidade (g.L<sup>-1</sup>), possibilitando a redução do número de experimentos para ter uma pré-ideia sobre o processo em estudo. É aplicável em experimentos de alto custo ou tempo e quando há pouco ou nenhum conhecimento sobre o comportamento do processo em questão.

Amaral *et al.* (2015) fez o uso do método de Taguchi utilizando uma matriz ortogonal L<sub>8</sub> para determinar os fatores mais influentes no processo de cultivo da microalga *Chlorella* sp. Os fatores analisados foram: intensidade da luz (0,85 e 14,50 klux), NaNO<sub>3</sub> (0,025 e 0,075 g.L<sup>-1</sup>), CO<sub>2</sub> (5 e 10%) e taxa de aeração (3,33 e 1,67 vvn). Ao realizar o delineamento experimental, o autor teve como resultado uma boa produção de biomassa microalgal ao usar 0,85 klux de intensidade luminosa, 0,075 g.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, enquanto que a

produção de lipídeos foi influenciada positivamente na concentração de  $0,025 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ . A taxa de aeração não mostrou-se significativa nestes processos.

### 2.7.2 Razão Sinal/Ruído (S/N)

A razão Sinal/Ruído (*Signal of Noise*, em inglês) se encaixa no método de Taguchi para investigar a variabilidade de resposta, reduzindo a variação da característica de qualidade. De acordo com as equações (1), (2) e (3), a função da razão S/N é dividida em três classes (NETO *et al.*, 2010):

#### 2.7.2.1 Menor é melhor

A equação (1) tem como objetivo minimizar os resultados obtidos no processo.

$$\frac{S}{N} = -10 \log \sum \frac{y_i^2}{n} \quad (1)$$

Sendo  $n$  equivalente ao número de respostas de cada experimento, e  $y_i$  ao valor da resposta na condição experimental, sendo  $i$  um valor inteiro e positivo.

#### 2.7.2.2 Maior é melhor

O objetivo da equação (2) é maximizar os resultados obtidos no processo.

$$\frac{S}{N} = -10 \log \sum \frac{1}{y_i^2} \quad (2)$$

#### 2.7.2.3 Nominal é melhor

Quando o objetivo é reduzir a variabilidade em torno de um valor nominal em um processo, a equação (3) deve ser utilizada.

$$\frac{S}{N} = 10 \log \sum \frac{\bar{y}_i^2}{s^2} \quad (3)$$

Sendo  $y$  valendo a  $n$  e  $y_i$  e  $S$  equivalente a 2.

As réplicas e os efeitos dos níveis de ruído definem o valor da razão S/N com a observação de apenas um resultado observado, possibilitando analisar a média e variação das características qualitativas do processo (RANA *et al.*, 2014).

### **2.7.3 Análise de Variância**

A Análise de Variância (ANOVA) é uma tabela que permite analisar estatisticamente os dados obtidos pelo Planejamento de Experimentos, tornando possível fazer a comparação de mais de dois fatores e testar a significância da regressão por meio do teste F. Este teste é utilizado para definir as interações e fatores mais significantes no processo. Com os resultados obtidos por meio da ANOVA, é possível validar os modelos estatísticos e criar novas formas para calcular coeficientes para modelar o processo (MONTGOMERY, 2008).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMO

Foi utilizada uma linhagem da microalga marinha *C. minutissima* gentilmente cedida pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da USP campus de São Paulo ao professor Dr. Messias Borges Silva do Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) e do Departamento de Engenharia de Produção da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG-UNESP).

#### 3.2 MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o preparo do inóculo, utilizou-se o meio de cultivo F/2 (GUILLARD & RYTHER, 1962) sem a adição de vitaminas; este foi composto por 10% de conteúdo celular da cepa da microalga *C. minutissima*. Na Tabela 2 é possível observar a composição do meio de cultivo utilizado.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo F/2.

	Reagentes	Concentração
	NaCl	30,00 g.L <sup>-1</sup>
	NaNO <sub>3</sub>	75,00 g.L <sup>-1</sup>
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5,00 g.L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9 H <sub>2</sub> O	30,00 g.L <sup>-1</sup>
Metais-traço	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,80 mg.L <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,20 mg.L <sup>-1</sup>
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,00 mg.L <sup>-1</sup>
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180,00 mg.L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,30 mg.L <sup>-1</sup>
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15 g.L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> EDTA	4,36 g.L <sup>-1</sup>

Fonte: Guillard & Ryther (1962).

Para evitar a precipitação dos sais durante o processo de autoclavagem (121°C por 15 min), soluções de cada reagente foram preparadas e autoclavadas separadamente da água com NaCl para posterior formação do meio F/2. O inóculo foi cultivado durante 14 dias para posterior réplica dos experimentos no arranjo ortogonal L<sub>8</sub> de Taguchi.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores no Laboratório de Pesquisas e no Laboratório de Caracterização de Biocombustíveis do Departamento de Energia da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG-UNESP) sob regime de batelada em temperatura ambiente com retirada diária de amostras experimentais.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para determinar a concentração celular por espectrofotometria, foi necessário realizar a (i) determinação do peso seco e a (ii) construção da curva padrão. O cálculo do peso seco foi utilizado para converter o valor da absorvância obtido por meio das medidas espectrofotométricas em concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

#### 3.3.1 Determinação do peso seco

Para determinação da concentração de biomassa em peso seco, foram construídos recipientes de papel alumínio posteriormente tarados em estufa a  $100^\circ\text{C}$ . Realizou-se uma coleta de 3 mL da suspensão celular em meio F/2 e inseridas nos recipientes de papel alumínio (Figura 12). Com o intuito de subtrair o peso de NaCl da concentração final das amostras, um teste com 3 mL de solução salina (NaCl 30%) deve ser realizado. As amostras foram incubadas em estufa a  $100^\circ\text{C}$  até obter peso constante.

Figura 12 - Amostras de suspensão celular e solução salina (NaCl) 30%.

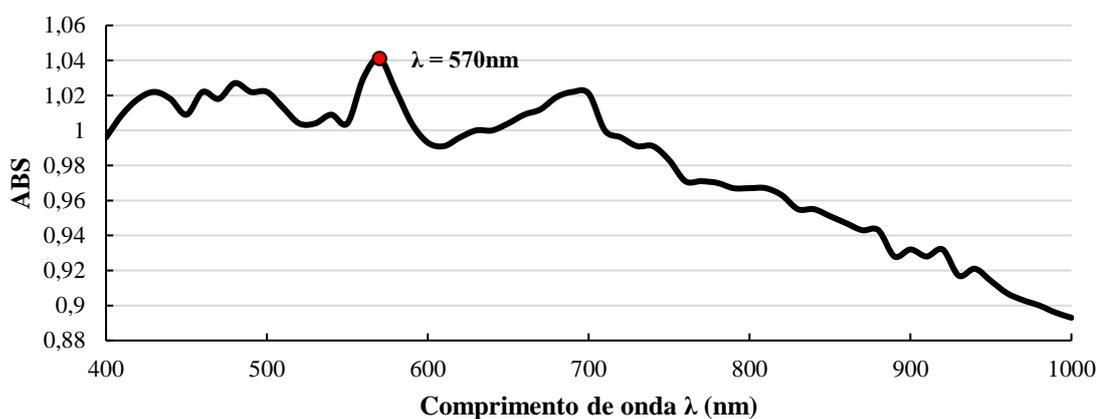


Fonte: Autora.

### 3.3.2 Construção da curva padrão

O crescimento celular da microalga *C. minutissima* foi determinado a partir da suspensão de células por meio de análise da densidade óptica da cultura em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1280), com comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) definido a partir da varredura na região da luz visível (400 a 1000 nm). Para o branco, utilizou-se água deionizada. Na Figura 13, observa-se o comprimento de onda para as avaliações espectrofotométricas, onde a maior absorção foi observada a 570 nm. Portanto, este foi o comprimento de onda utilizado para a leitura das amostras.

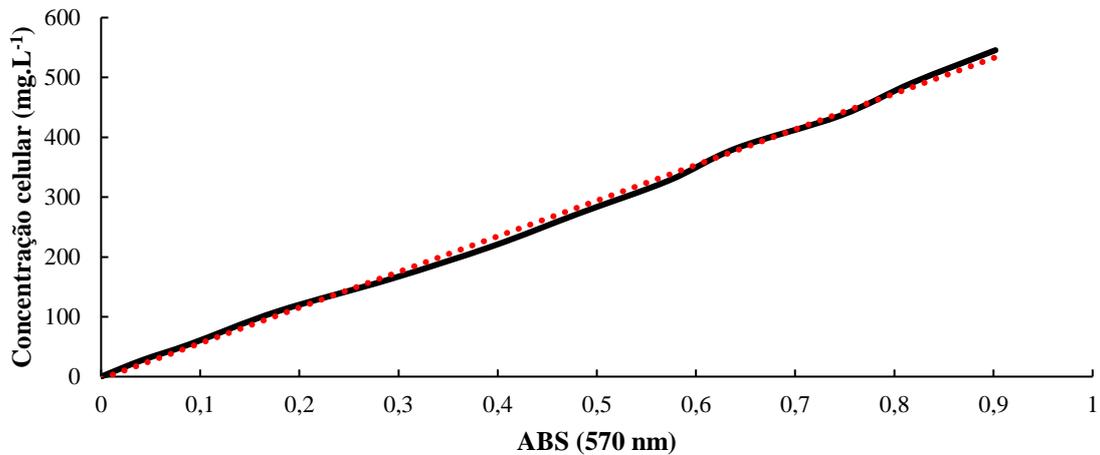
Figura 13 - Espectro de varredura UV vis (400 a 1000 nm) da suspensão de células da microalga *C. minutissima*.



Fonte: Autora.

A curva padrão (Figura 14) foi construída realizando diluições contínuas a partir de uma amostra de suspensão celular, obtendo-se a equação (4) da reta e o coeficiente de determinação  $R^2$ .

Figura 14 - Curva padrão do crescimento celular da microalga *C. minutissima*.



Fonte: Autora.

$$y = 595,75 X \text{ABS}_{570} - 3,7526 \quad (R^2 = 0,9979) \quad (4)$$

Ao plotar os valores obtidos por espectrofotometria na equação obtida pela curva padrão, foi possível converter estes resultados em  $\text{mg.L}^{-1}$  como também identificar as seguintes fases do ciclo de crescimento da microalga *C. minutissima*: (i) fase de latência (lag), (ii) fase exponencial (log), (iii) fase estacionária e (iv) fase de declínio.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir dos métodos de Guimarães (2016). Após o ajuste dos parâmetros para determinar o crescimento celular, o cultivo da microalga em estudo foi realizado durante 15 dias com o objetivo de identificar as seguintes fases do ciclo de vida celular: (i) fase de latência (lag) ou adaptação, (ii) fase exponencial (log) ou aceleração do crescimento celular, (iii) fase estacionária (desaceleração do crescimento celular) e (iv) fase de declínio (morte celular).

#### 3.4.1 Produtividade

A produtividade celular foi calculada com a equação (5).

$$P = \frac{(X_f - X_i)}{(t_f - t_i)} \quad (5)$$

Sendo que:

$P$  = produtividade ( $\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ );

$X_f$  = densidade celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t_f$ ;

$X_i$  = densidade celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t_i$ .

### 3.4.2 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento determina a formação de biomassa por unidade de biomassa existente no fotobiorreator por unidade de tempo, podendo ser calculada com a equação (6).

$$r = \frac{(\ln \frac{X_f}{X_i})}{(t_f - t_i)} \quad (6)$$

Sendo que:

$r$  = taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ );

$\ln$  = logaritmo neperiano de  $\frac{X_f}{X_i}$ ;

$X_i$  = densidade celular no tempo  $t_i$  ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$X_f$  = densidade celular no tempo  $t_f$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

### 3.4.3 Tempo de duplicação

O tempo de duplicação, também chamado de tempo de geração, é o tempo necessário para uma determinada população dobrar de número (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016), podendo ser calculado de acordo com a equação (7).

$$K = \frac{r}{\ln 2} \quad (7)$$

Sendo que:

$K$  = tempo de duplicação ( $\text{dia}^{-1}$ );

$r$  = taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ );

$\ln$  = logaritmo neperiano de 2.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

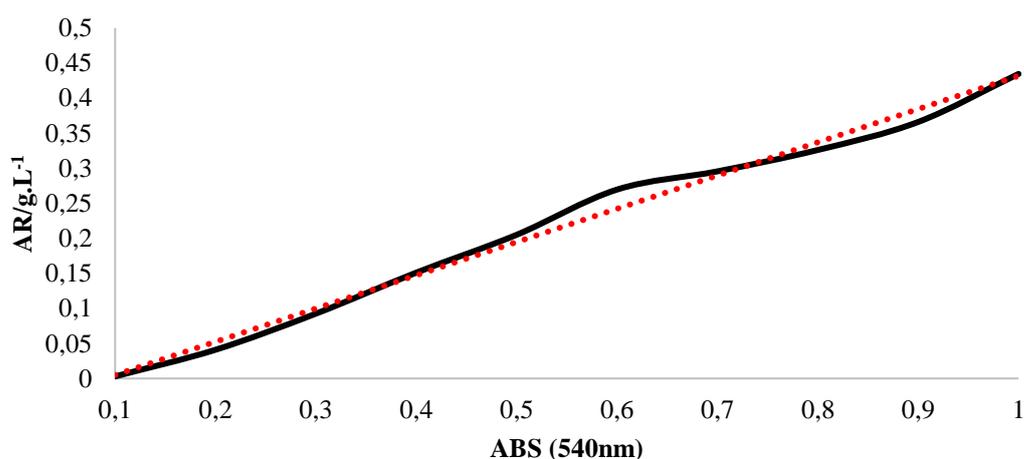
Para determinar a quantidade de açúcares redutores nos cultivos, foi realizado o teste DNS (ácido dinitrosalicílico) que, na reação entre o ácido 3,5-dinitrosalicílico e o açúcar redutor, é reduzido pelo ácido 3-amino5-nitrosalicílico, que oxida o monossacarídeo redutor (MALDONADE *et al.*, 2013). Os reagentes necessários para a realização deste teste foram: ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), hidróxido de sódio (NaOH 2N), fenol, ácido clorídrico (HCl 2N), tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Os preparos das soluções são descritos a seguir:

#### 3.5.1 Solução padrão e determinação da curva padrão

Para o preparo da solução padrão, deve-se pipetar 1mL da solução de glicose (10%), dissolvendo-a em 20 mL de água deionizada com agitação constante. Esta solução deve ser transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada e homogeneizando a solução.

A curva padrão (Figura 15) foi determinada por meio da realização de diluições contínuas da amostra de glicose, obtendo-se assim, a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Figura 15 - Curva padrão de açúcares redutores (AR) em  $\text{g.L}^{-1}$



Fonte: Autora.

O cálculo da quantidade de açúcar redutor para a construção da curva padrão foi feito conforme a equação (8).

$$\text{AR Glicose (g. L}^{-1}\text{)} = 0,4742 \times \text{ABS}_{540} + 0,0424 \quad (\text{R}^2 = 0,9917) \quad (8)$$

### 3.5.2 Reagente DNS

A fim de obter 1 L de solução, pesou-se 5,3 g do ácido 3,5-dinitrosalicílico e 9,9 g de NaOH, dissolvendo estes reagentes em 708 mL de água deionizada. Adicionou-se 3,8 mL de fenol previamente fundido a 50° C e 4,15 g de metabissulfito de sódio. A solução do reagente DNS é fotossensível e deve ser armazenada em frasco âmbar coberto por papel alumínio em refrigerador.

### 3.5.3 Solução de Tartarato duplo de sódio e potássio

Dissolveu-se 15,1 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ) em 1 L de água deionizada. A solução foi armazenada em frasco âmbar em temperatura ambiente.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA

A clorofila foi determinada de acordo com Lv *et al.* (2017) com algumas modificações. As células foram centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos e, após a retirada do sobrenadante, foram suspensas em Álcool Etílico Absoluto 99,8%. A suspensão logo foi colocada em lavadora ultrassônica (Eco - sonics 1,8L) (Figura 16) por 1 hora e depois mantida a 4° C no escuro por 24 horas.

Figura 16 - Amostras dos experimentos submetidas em banho ultrassom.



Fonte: Autora.

Após o tempo decorrido, as amostras foram centrifugadas novamente a fim de eliminar os detritos celulares e lidas a 649 e 665 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1280). Uma solução de Álcool Etílico Absoluto 99,8% foi utilizada como branco. As concentrações de clorofila *a* e de clorofila *b* podem ser calculadas na equação (9) e na equação (10), respectivamente.

$$\text{Clorofila } a = 13,95 \times \text{ABS}_{665} - 6,88 \times \text{ABS}_{649} \quad (9)$$

$$\text{Clorofila } b = 24,96 \times \text{ABS}_{649} - 7,32 \times \text{ABS}_{665} \quad (10)$$

### 3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VAREDA (MEV)

A morfologia superficial das microalgas foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com um microscópio eletrônico de varredura disponível no Laboratório de Análise de Imagens de Materiais da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG-UNESP) com voltagem de 15 a 20 kW. A princípio, as amostras foram metalizadas a ouro e com faixa de magnificação variando de 30 a 300000 vezes.

### 3.8 OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

Amaral *et al.* (2009) definem que os tratamentos físicos e químicos atingem ótimos níveis de eficiência, porém, têm custos elevados. O sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2\text{SO}_4)_3$  pode ser utilizado para remover matérias orgânicas e inorgânicas no meio aquoso, todavia, não é fácil

tratar o precipitado resultante desta reação química, além do uso de reagentes químicos ter alto custo.

Portanto, após o cultivo celular, a biomassa foi recuperada por floculação induzida por solução 1N de sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2\text{SO}_4$ )<sub>3</sub>. Para cada litro do cultivo, utilizou-se 2 mL de solução (ZORN *et al.*, 2017). A biomassa obtida foi filtrada a vácuo com papel de filtro antecipadamente tarado e lavada com água deionizada para remover os sais e ser submetida à secagem em estufa a 50° C.

### 3.9 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As análises termogravimétricas da biomassa de microalgas foram realizadas em analisador termogravimétrico (TA Instruments Q600 SDT), operando sob fluxo de nitrogênio a 100 mL.min<sup>-1</sup> em temperatura de 40 a 600° C, utilizando cadinho de  $\alpha$ -alumina de 900  $\mu\text{L}$  contendo 5 mg da amostra. A determinação do teor de água deve ser feita de modo dinâmico (FARIA, 2002), utilizando a primeira derivada da curva de TGA para identificar os pontos de início e de fim da análise térmica entre um intervalo de 30 a 800° C para determinar a perda de massa e a temperatura de degradação em cada etapa do processo.

As etapas constituem-se em: (i) aquecer o analisador termogravimétrico em temperatura ambiente até 105° C, mantendo essa temperatura por 12 minutos, (ii) aquecer a rampa a 250° C a 10° C por minuto, mantendo 250° C por 30 minutos e (iii) aumentar a temperatura da rampa para 575° C a 20° C por minuto e manter a 575° C por 180 minutos, finalizando o procedimento.

### 3.10 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

#### 3.10.1 Influência da luminosidade na produção de microalgas utilizando fontes de CO<sub>2</sub>

Foi proposto um arranjo ortogonal L<sub>4</sub> do método de Taguchi feito em quatro réplicas para analisar três fatores inseridos na proporção de dois níveis no processo de cultivo: luz, aeração e mel. A matriz experimental codificada é representada pela Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz experimental codificada.

Exp.	Luz	Aeração	Mel
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Fonte: Autora.

Os cultivos foram feitos em regime de batelada em temperatura ambiente. Os fotobiorreatores submetidos à iluminação ficaram expostos à 6 lâmpadas fluorescentes de cor branca em ciclo de 24 horas. Foram retiradas amostras diárias para análise do pH do meio de cultivo. A matriz experimental pode ser observada na Figura 17.

Figura 17 - Matriz experimental L<sub>4</sub> de Taguchi com quatro réplicas.

Fonte: Autora.

Para determinar o crescimento celular, utilizou-se um espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1280) pelo método indireto por densidade óptica da cultura com auxílio de cubeta de quartzo. O comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) para realizar a leitura das amostras foi determinado pela varredura na região da luz visível ( $\lambda=570$  nm). Para o branco, utilizou-se água deionizada.

A curva padrão foi determinada por meio da realização de diluições contínuas de

amostra de suspensão celular, obtendo-se assim, a equação da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ), conforme equação (11).

$$Y = 595,75 \times ABS + 3,7526 \quad (R^2 = 0,9979) \quad (11)$$

Ao final realizou-se a extração de clorofila *a* de acordo com os métodos de Lv *et al.* (2017). O cálculo do teor de clorofila *a* pode ser realizado na equação (9). Utilizou-se o *software* Minitab® 19 a fim de obter os dados estatísticos do melhor ajuste dos fatores.

$$\text{Clorofila } a = 13,95 \times A_{665} - 6,88 \times A_{649} \quad (9)$$

### 3.10.2 Crescimento da microalga *C. minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos

#### 3.10.2.1 Sulfametoxazol e Trimetoprima

Para avaliação do crescimento da microalga *C. minutissima* em presença dos antibióticos Sulfametoxazol e Trimetoprima, foram utilizados fotobiorreatores com capacidade total de 5L de volume de trabalho, iluminados por 4 lâmpadas fluorescentes de cor branca, 18 W em ciclo de 24h. A aeração foi realizada por compressor de ar (Xilong, AP-003).

Para avaliação da influência dos fatores (concentração de antibióticos, concentração de nitrato e aeração) na variável resposta biomassa produzida (g), foi aplicado o método Taguchi em matriz  $L_4$  para o planejamento experimental. Na Tabela 4 são detalhadas as variáveis de entrada, seus parâmetros e os respectivos níveis selecionados e, na Tabela 5 é exposto o arranjo ortogonal da matriz  $L_4$  de Taguchi.

Tabela 4 - Matriz experimental com seus respectivos níveis e fatores.

Código	Fatores	Nível baixo (1)	Nível alto (2)
A	Antibióticos (g.L <sup>-1</sup> )	0,005	0,025
B	Nitrato (g.L <sup>-1</sup> )	75,000	150,000
C	Aeração	Isento	Borbulhamento

\*Antibióticos refere-se ao Sulfametoxazol e Trimetoprima.

Fonte: Autora.

Tabela 5 - Arranjo ortogonal L<sub>4</sub> Taguchi.

Exp.	Fatores		
	Antibióticos	Nitrato	Aeração
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Fonte: Autora.

### 3.10.2.2 Antibiótico: Ceftriaxona sódica

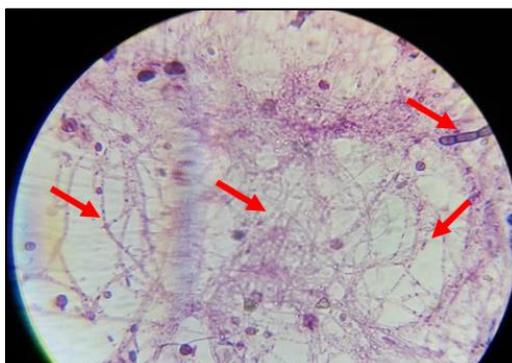
Os testes com o antibiótico Ceftriaxona sódica foram realizados em duas concentrações diferentes: 1 g.L<sup>-1</sup> (para nível baixo) e 2 g.L<sup>-1</sup> (para nível alto). O pó foi diluído diretamente nos respectivos meios de cultivos.

### 3.10.2.3 Antifúngicos: Fluconazol, Miconazol, Cetoconazol e Timidazol

Para prevenir a contaminação dos cultivos por fungos, realizou-se testes com os antifúngicos Fluconazol, Miconazol, Cetoconazol e Timidazol em duas concentrações diferentes: 0,005 g.L<sup>-1</sup> (para nível baixo) e 0,01 g.L<sup>-1</sup> (para nível alto). O pó foi diluído diretamente nos respectivos meios de cultivos.

Na Figura 18 é possível observar que o cultivo da microalga *C. minutissima* em presença de somente do antibiótico Ceftriaxona sódica promoveu a contaminação do meio de cultivo por fungos (presença de muitas hifas). Porém, este antibiótico não causou a degradação de clorofila.

Figura 18 - Pseudo-hifas de fungos contaminantes (100×).



Fonte: Autora.

Portanto, foi necessário realizar testes com alguns antifúngicos juntamente com o antibiótico escolhido para a prevenção de fungos contaminantes no meio de cultivo. Os testes avaliaram a interação do antibiótico com os antifúngicos: Timidazol ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ), Cetoconazol ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ), Miconazol ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ) e Fluconazol ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ). Por ter sido o único fármaco não degradante de clorofila, o Fluconazol ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ) também foi avaliado separadamente do antibiótico.

### 3.11 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Utilizando o método de Taguchi, foi possível analisar as seguintes variáveis respostas: (i) crescimento celular (em  $\text{g.L}^{-1}$ ), (ii) tempo de floculação da biomassa (em minutos) e (iii) produção de clorofila *a* (em  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

#### 3.11.1 Método de Taguchi

Para determinar a influência dos fatores nas variáveis respostas, utilizou-se uma matriz  $L_8$  de Taguchi para o planejamento experimental exploratório. Foram propostos 6 fatores: luz, aeração, Fluconazol (antifúngico), mel, glicose e sacarose. O antifúngico Fluconazol foi escolhido para este experimento por ter obtido maior concentração celular e prevenir a contaminação por fungos nos cultivos. Na Tabela 6, os fatores Fluconazol, mel, glicose e sacarose são listados com suas respectivas quantidades.

Tabela 6 - Concentração dos fatores Fluconazol (antifúngico), mel, glicose e sacarose.

Fatores	Nível baixo (1)	Nível alto (2)
Fluconazol	$0,005 \text{ g.L}^{-1}$	$0,01 \text{ g.L}^{-1}$
Mel	Isento	$1 \text{ mL.L}^{-1}$
Glicose	Isento	$1 \text{ mL.L}^{-1}$
Sacarose	Isento	$1 \text{ mL.L}^{-1}$

Fonte: Autora.

Para as análises estatísticas utilizou-se o *software* Minitab® 19. Na Tabela 7 estão listados os parâmetros de controle e níveis para seleção das variáveis significativas utilizando a matriz  $L_8$  do método de Taguchi e, no Quadro 4 nota-se a matriz experimental utilizada para o planejamento.

Tabela 7 - Parâmetros de controle e níveis usados para selecionar as variáveis significativas no cultivo da microalga *C. minutissima*.

Códigos	Fatores	Nível baixo (1)	Nível alto (2)
A	Luz	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
B	Aeração	Isento	Borbulhamento
C	Fluconazol	$5 \times 10^{-4} \%$	$1 \times 10^{-3} \%$
D	Mel	Isento	1,0 mL
E	Glicose	Isento	10 % (p/v)
F	Sacarose	Isento	50 % (p/v)

Fonte: Autora.

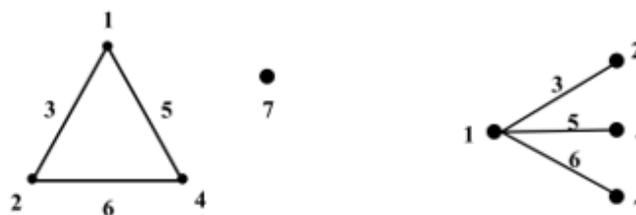
Quadro 4 - Matriz experimental segundo o planejamento de Taguchi  $L_8$ .

Experimento	Fatores codificados					
	A	B	C	D	E	F
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2
4	1	2	2	2	2	1
5	2	1	2	1	2	1
6	2	1	2	2	1	2
7	2	2	1	1	2	2
8	2	2	1	2	1	1

Fonte: Autora.

O gráfico linear da matriz  $L_8$  de Taguchi pode ser observado na Figura 19.

Figura 19 - Gráficos lineares de Taguchi para a matriz experimental  $L_8$ .



Fonte: Ranjit (2010).

Como o objetivo da variável resposta (ii) tempo de floculação da biomassa (em minutos), foi minimizar o tempo de floculação da biomassa, a equação (1) (menor é melhor) deve ser utilizada para obter a razão S/N para posterior análise de variância (ANOVA).

$$\frac{S}{N} = -10 \log \sum \frac{y_i^2}{n} \quad (1)$$

Já para as variáveis respostas (i) crescimento celular (em g.L<sup>-1</sup>) e (iii) produção de clorofila *a* (em mg.L<sup>-1</sup>), deve ser utilizada a equação (2), a fim de maximizar estes processos.

$$\frac{S}{N} = -10 \log \sum \frac{1}{n} \quad (2)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão analisados e apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento dos métodos.

### 4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

#### 4.1.1 Influência da luminosidade na produção de microalgas utilizando fontes de CO<sub>2</sub>

Utilizando o método proposto por Taguchi (1986), foi possível analisar os efeitos dos três fatores (luz, aeração e mel) implantados no processo de cultivo. A matriz L<sub>4</sub> decodificada com os resultados pode ser observada na Tabela 8.

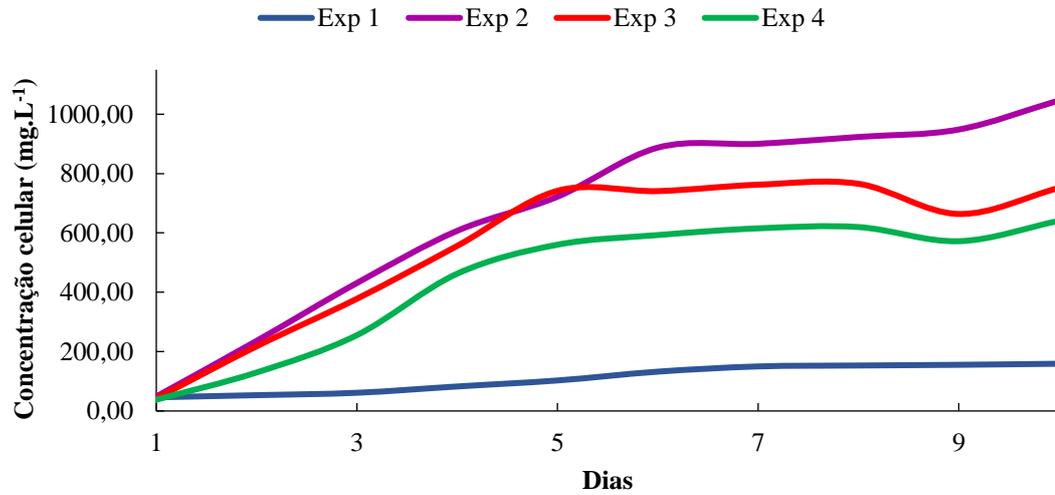
Tabela 8 - Arranjo ortogonal L<sub>4</sub> decodificado.

Exp.	Luz	Aeração	Mel	Réplicas (biomassa em mg.L <sup>-1</sup> )				Média (mg.L <sup>-1</sup> )
1	Isento	Isento	Isento	146,37	143,99	164,24	182,12	159,19
2	Isento	Borbulhamento	1 mL.L <sup>-1</sup>	626,79	1118,28	1250,54	1190,78	1046,60
3	24h	Isento	1 mL.L <sup>-1</sup>	564,41	899,22	583,06	961,00	751,93
4	24h	Borbulhamento	Isento	858,71	795,56	856,33	899,22	640,88

Fonte: Autora.

O crescimento celular foi acompanhado diariamente por espectrofotometria durante 10 dias de cultivo, podendo ser observado na Figura 20.

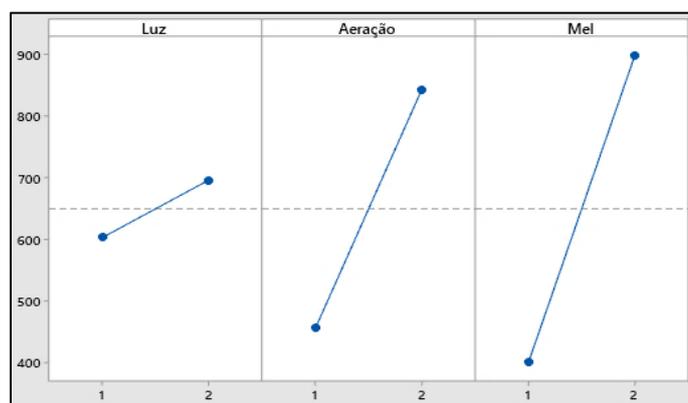
Figura 20 - Curva de crescimento celular referente às 4 condições de cultivo testadas.



Fonte: Autora.

As condições do Experimento 2 (sem luz, e com aeração e mel em nível alto) foram favoráveis para aumentar a produção de biomassa no meio de cultivo. Na Figura 21, é possível observar os efeitos, em relação à média, que cada fator exerce sobre a variável resposta em estudo. Observa-se que os fatores aeração e mel têm melhor ajuste em nível alto, enquanto a luminosidade não manifestou relevância para a produção de biomassa, portanto, esta foi retirada da ANOVA.

Figura 21 - Efeito dos fatores sobre a média.



Fonte: Minitab® (2020).

A ANOVA, com grau de confiança de cada fator determinado por meio do teste F, foi feita para considerar os fatores de maior influência (significância estatisticamente comprovada) no processo de produção de biomassa da *C. minutissima* (Tabela 9).

Tabela 9 - ANOVA referente à produção de biomassa em relação à média.

Fonte	SQ	GL	SMQ	F	p
Aeração	145241	1	145241	3183,01	0,011
Mel	359394	1	359394	7876,27	0,007
Erro	46	1	46	-	-

Fonte: Autora.

Com base nos resultados obtidos na ANOVA, pode-se afirmar com 95% de confiança que a aeração e o mel foram significantes para o processo de produção de biomassa; porém, o mel exerce maior influência sobre esta variável resposta. Este fator possui componentes orgânicos que servem como fonte de energia em cultivos de microalgas, beneficiando a produção de células (GROBBELAAR, 2003).

Chiranjeevi e Mohan (2016) analisaram a produção de biomassa de microalgas utilizando uma matriz ortogonal  $L_{18}$  de Taguchi. Dos oito fatores analisados, dois deles foram a iluminação e a aeração. Os experimentos obtiveram maior produção de biomassa na presença de luz. O metabolismo fotossintético e respiratório em meio mixotrófico proporcionaram aumento na concentração de biomassa.

O carbono orgânico adicionado ao meio de cultivo de microalgas propõe maior taxa de crescimento quando comparada à utilização de carbono inorgânico por vias fotossintéticas (OLIVER & ATSUMI, 2014). De acordo com Ren (2016), quando submetidas à fonte de carbono orgânica inserida no meio de cultivo, as microalgas possuem crescimento celular elevado, assim como o metabolismo respiratório.

Na Tabela 10, observa-se a matriz  $L_4$  de Taguchi, as variáveis de entrada codificadas e decodificadas e a variável resposta. Nota-se que a condição do Experimento 2 (sem luz, com aeração, e adição de mel em nível alto ( $2\text{mL.L}^{-1}$ )) favoreceu a produção de clorofila *a*. Na Tabela 11 pode-se observar a ANOVA da produção de clorofila *a* em relação média, indicando que apenas a variável iluminação foi relevante com  $F_{\text{calc}} \geq 2$  (PADKE, 1989).

Tabela 10 - Matriz L<sub>4</sub> de Taguchi com as variáveis codificadas, decodificadas, e variável resposta.

Exp	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Variável Resposta
	A	B	C	Luz	Aeração	Mel (mL.L <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>a</i> (mg.L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	Isento	Isento	1,00	0,44 ± 0,03
2	1	2	2	Isento	Borbulhamento	2,00	0,78 ± 0,14
3	2	1	2	24h	Isento	2,00	0,29 ± 0,06
4	2	2	1	24h	Borbulhamento	1,00	0,33 ± 0,11

Fonte: Autora.

Tabela 11 - ANOVA referente à produção de clorofila *a* em relação à média.

Fonte	SQ	GL	SMQ	F	p
Iluminação	0,09	1	0,09	4,00	0,29
Aeração	0,04	1	0,04	1,60	0,42
Erro	0,02	1	0,02	-	-

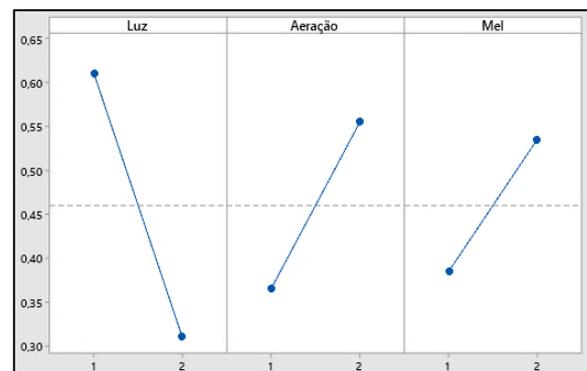
Fonte: Autora.

Os experimentos realizados podem ser observados na Figura 22a. De acordo com a Figura 22b, o ajuste dos fatores aeração e adição de mel em nível alto e iluminação em nível baixo contribuiu com o aumento da produção de clorofila *a*.

Figura 22 - (a) Sistema de fotobiorreatores e (b) Efeito dos fatores sobre a média da produção de clorofila *a*.



Fonte: Autora.



Fonte: Minitab® 19 (2020).

A aeração estimula a produção celular em cultivos de microalgas e atua na distribuição homogênea de células ao longo do fotobiorreator. Permite ainda, que a iluminação seja uniforme favorecendo a fotossíntese (GROBBELAAR, 2003; PALUDO, 2012). A iluminação

é um fator fundamental na produção de clorofila (BERTOLDI *et al.*, 2008). De fato, no presente estudo a luz foi o fator de maior relevância, porém não estimulou a produção deste pigmento, e por essa razão deve ser ajustada em nível baixo (ausente).

Cultivos em regime fotoheterotróficos (iluminação em período integral e com oferta de carbono orgânico) e heterotróficos (sem iluminação e com oferta de carbono orgânico) normalmente apresentam perfil de crescimento celular diferente. No presente trabalho, a adição de mel e, conseqüentemente, de açúcares, associada a oferta de luz resultou em menor produção de clorofila *a* quando comparada aos cultivos sem oferta de luz, porém com presença de açúcares. Esta condição sugere que as células desviaram o seu metabolismo em direção ao consumo de açúcares, caracterizando o cultivo em regime heterotrófico. Neste caso, a produção de clorofila não foi priorizada, visto que o consumo da fonte de carbono orgânico foi favorecido.

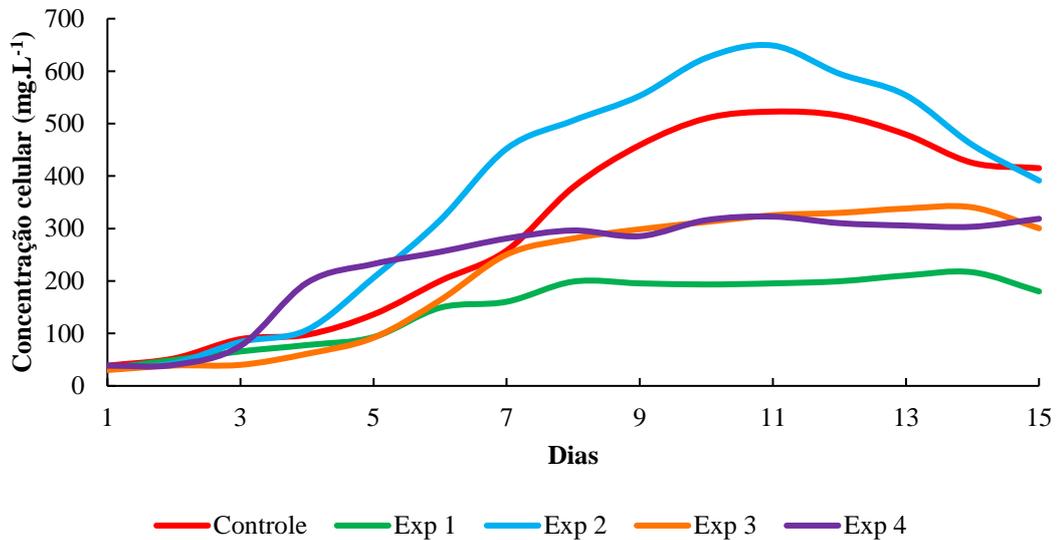
#### **4.1.2 Crescimento da microalga *C. minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos**

Como a iluminação não mostrou ser um fator significativo, esta foi retirada da matriz ortogonal e inserida como um fator constante e, em seu lugar, foram avaliados a presença de fármacos antimicrobianos no cultivo da microalga *C. minutissima*.

##### **4.1.2.1 Antibióticos Sulfametoxazol e Trimetoprima**

De acordo com a Figura 23, o crescimento da microalga foi dependente das condições experimentais. Esta informação está de acordo com Lourenço (2006), que verificou alterações no crescimento microalgal variável de acordo com a temperatura e o pH do meio de cultivo, nutrientes disponibilizados, concentração salina e de CO<sub>2</sub> dissolvido.

Figura 23 - Perfil de crescimento da microalga *C. minutissima*.



Fonte: Autora.

O Experimento 1 não apresentou crescimento celular relevante quando comparado aos demais. Conforme Grima *et al.*, (1996), Borghetti, (2009) e Paludo, (2012) a injeção de ar nos cultivos permite a difusão dos nutrientes ofertados, evita a sedimentação das células e garante a incidência luminosa. No referido experimento, a microalga foi cultivada sem aeração, indicando uma possível causa para redução do crescimento. O Experimento 4, também sem injeção de ar, resultou em fase lag (adaptação) longa, sendo que no 8º dia houve um declínio na proliferação celular. O Experimento 2, por sua vez, apresentou crescimento exponencial relevante quando comparado ao controle. No entanto, o Experimento 3 não apresentou crescimento satisfatório. Além disso, o crescimento exponencial foi observado somente a partir do 8º dia de cultivo.

De acordo com a Figura 24, os experimentos com maior produção de biomassa após os 15 dias de cultivo foram  $2 > 3 > 4 > 1$ . Ressalta-se que a melhor condição de cultivo para a produção de biomassa nas condições experimentais avaliadas foi: concentração de antibióticos (0,005 g.L<sup>-1</sup>), nitrato (150 g.L<sup>-1</sup>) com aeração.

Figura 24 - Fatores decodificados, pH dos cultivos e biomassa final.

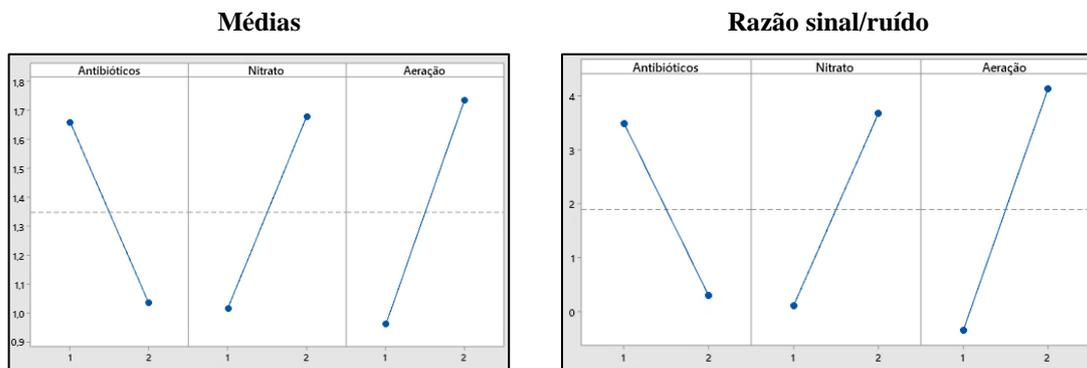


Exp.	Fatores decodificados			pH inicial	pH final	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
	Antibióticos (g.L <sup>-1</sup> )	Nitrato (g.L <sup>-1</sup> )	Aeração			
Controle	sem	75	com	7,1	8,1	1,39
1	0,005	75	sem	8,5	6,6	0,94
2	0,005	150	com	8,3	7,4	2,38
3	0,025	75	com	7,5	6,0	1,09
4	0,025	150	sem	7,8	5,9	0,98

Fonte: Autora.

A Figura 25 ilustra o efeito dos fatores em cada nível para a variável resposta “produção de biomassa”.

Figura 25 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob a produção de biomassa.



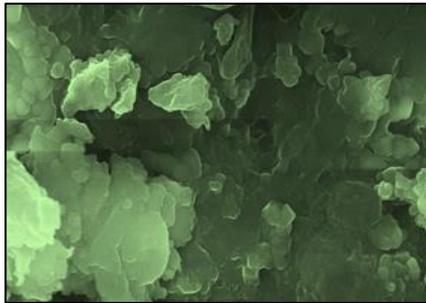
Fonte: Minitab® 19 (2020).

Nota-se que o crescimento das microalgas foi mais favorável nas condições de nível baixo (1) dos antibióticos e com nitrato e a aeração em nível alto (2).

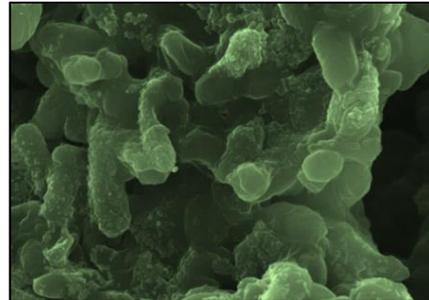
Na Figura 26 observa-se a morfologia celular da microalga *C. minutissima* em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nas condições experimentais propostas. Além da alteração morfológica provocada pela ação dos antibióticos, no Experimento 4, é possível

observar a formação de cristais, provavelmente proveniente da combinação entre os sais utilizados na suplementação e os sais presentes no meio de cultivo.

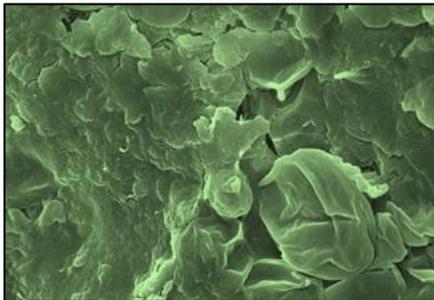
Figura 26 - Microscopia Eletrônica de Varredura (10.000K×) das células da microalga *C. minutissima* nas diferentes condições de cultivo.



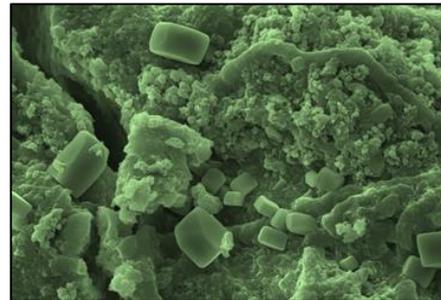
Experimento 1



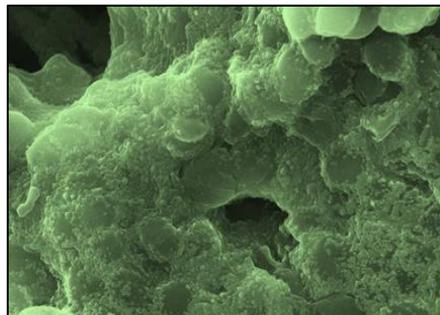
Experimento 2



Experimento 3



Experimento 4

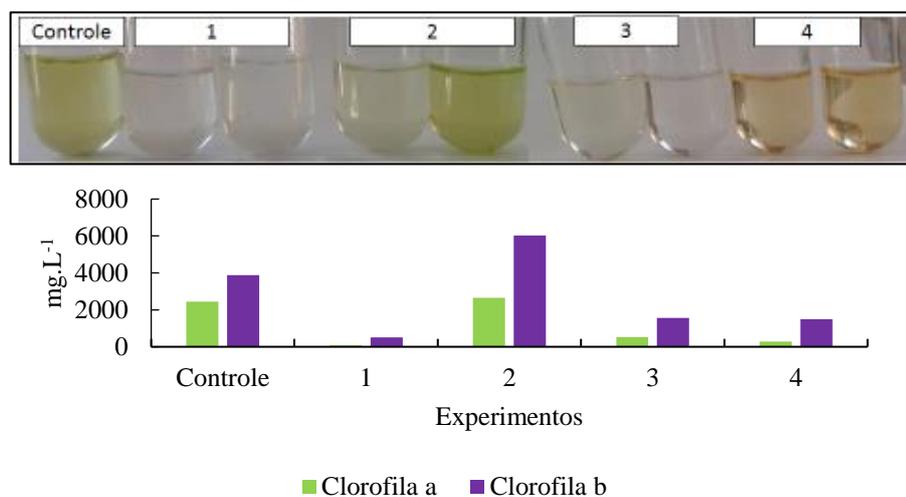


Controle

Fonte: Autora.

Na Figura 27, é possível observar que o Experimento 2 obteve maior produção de clorofila *a* e clorofila *b*.

Figura 27 - Perfil da concentração de clorofila *a* e de clorofila *b* após 15 dias de cultivo.



Fonte: Autora.

Os Experimentos 3 e 4 obtiveram coloração marrom durante o período de cultivo. Estes foram compostos por antibióticos em nível alto, o que sugere que os antibióticos Sulfametoxazol e Trimetoprima causam a degradação de clorofila.

Nota-se também que, após os 15 dias de cultivo houve maior síntese de clorofila *b* em relação a clorofila *a* pelas células, tanto do controle quando pelos cultivos realizados segundo a matriz de Taguchi. Resultados semelhantes foram encontrados por Simões *et al.* (2019).

No entanto, Bertoldi *et al.*, (2008); Ördög *et al.*, (2012) observaram resultados que se opõem aos obtidos nesta pesquisa, encontrando valores maiores de clorofila *a* em relação à clorofila *b* em seus experimentos. Este comportamento pode ser explicado por Teixeira e Granek (2017), que afirmam que a presença de antibióticos no cultivo pode inibir o crescimento celular, influenciando diretamente na síntese de proteínas responsáveis pela codificação de cloroplastos (clorofila *a* e *b*).

Além disso, o Experimento 2 forneceu a maior produção de pigmentos. Segundo Lourenço, (2006) e Paludo (2012), níveis altos de nitrato são essenciais para o desenvolvimento da célula microalgal, além de fazer parte da constituição dos pigmentos fotossintetizantes. Portanto, evidencia-se uma tendência de aumento na concentração de clorofila quando presente em quantidade abundante de nitrato.

No presente trabalho, a coloração dos cultivos variou de verde à marrom, de acordo com as condições experimentais e o tempo de cultivo (Figura 28).

Figura 28 - Alteração na coloração dos cultivos nos fotobiorreatores.



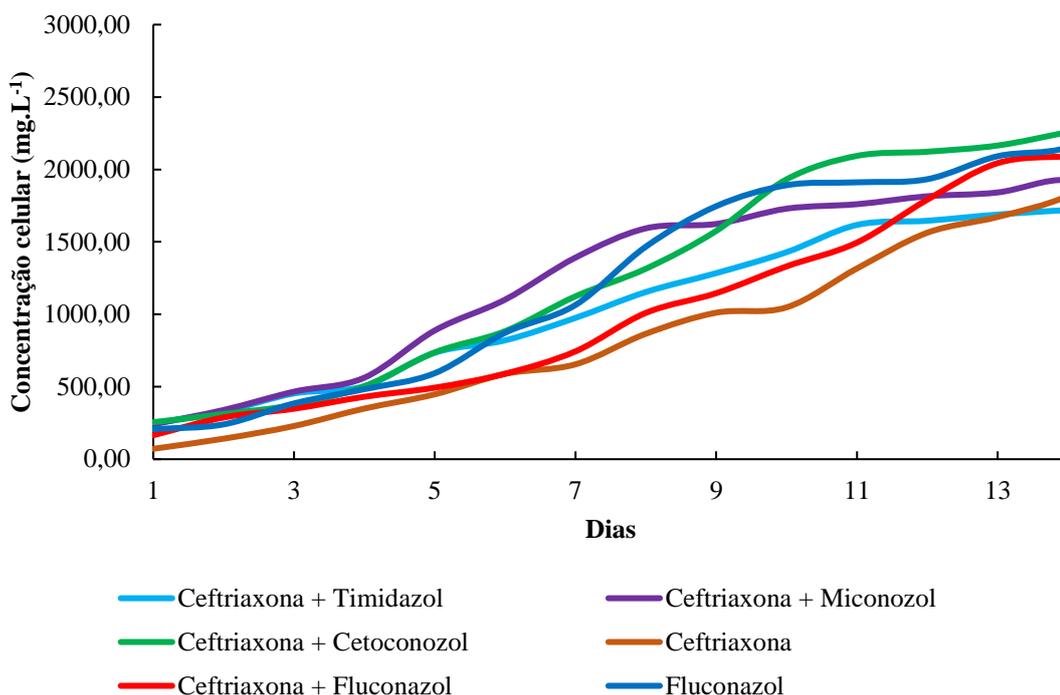
Fonte: Autora.

O cultivo da microalga *C. minutissima* apresenta coloração verde, em tonalidades diferentes, sendo decorrente da presença dos pigmentos clorofilianos (NELSON & COX, 2014). Situação semelhante foi observada por Dubé (1952), que relatou variação da coloração (verde e tons amarelados) de cultivos de *Chlorella vulgaris* crescida na presença do antibiótico Estreptomicina. A clorofila *a* é o pigmento mais abundante encontrado na natureza, correspondendo em torno de 75% dos pigmentos verdes (STREIT *et al.*, 2005; GROSS, 1991). A degradação de clorofila *a* pode ocorrer em diversas situações e interferir diretamente na coloração do meio de cultivo, pois produzem feopigmentos com coloração tendendo para marrom.

Portanto, nota-se que os antibióticos Sulfametoxazol e Trimetoprima foram os principais causadores da degradação de clorofila *a* e clorofila *b* quando inseridos em nível alto. Com isso, fez-se necessário realizar testes com outro antibiótico e, por ser de fácil diluição em água (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), o antibiótico Ceftriaxona sódica foi o escolhido.

A Figura 29 representa o gráfico do crescimento celular nos cultivos contendo o antibiótico Ceftriaxona interagido com os antifúngicos Timidazol, Miconozol, Cetoconozol e Fluconazol.

Figura 29 - Curva de crescimento celular de cultivos contendo diferentes fármacos.



Fonte: Autora.

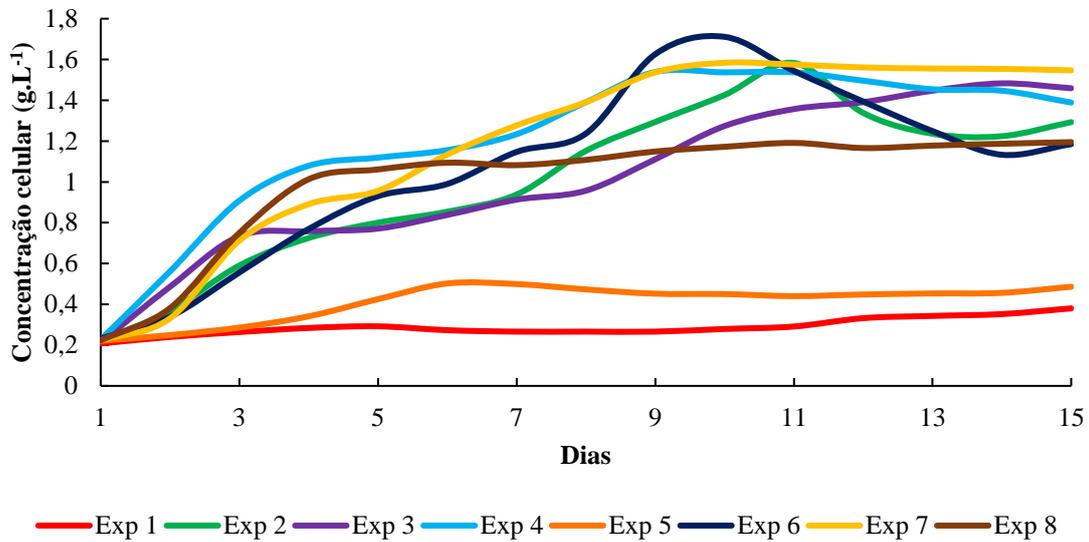
Os cultivos contendo somente o Fluconazol obtiveram maior produção celular quando comparados aos cultivos contendo somente o Ceftriaxona sódica. O antifúngico Cetoconazol quando interagido com o Ceftriaxona também proporcionou a produção de células, porém, este causou a degradação de clorofila, tanto em presença ou não do Ceftriaxona. No entanto, ao observar os cultivos contendo Fluconazol e Ceftriaxona, notou-se que estes fármacos têm boa interação e promovem a produção celular. Portanto, realizou-se um experimento em matriz  $L_8$  do método de Taguchi para avaliar o antifúngico Fluconazol (sem acréscimo de Ceftriaxona) sob determinadas variáveis respostas.

#### 4.3 CRESCIMENTO DA MICROALGA *C. minutissima* DE FLUCONAZOL

##### 4.3.1 Perfil do crescimento celular

O perfil do crescimento da microalga *C. minutissima* (Figura 30) foi estimado conforme a média dos valores obtidos a partir da duplicata da concentração celular (densidade das células).

Figura 30 - Curva de crescimento celular dos cultivos contendo o antifúngico Fluconazol.

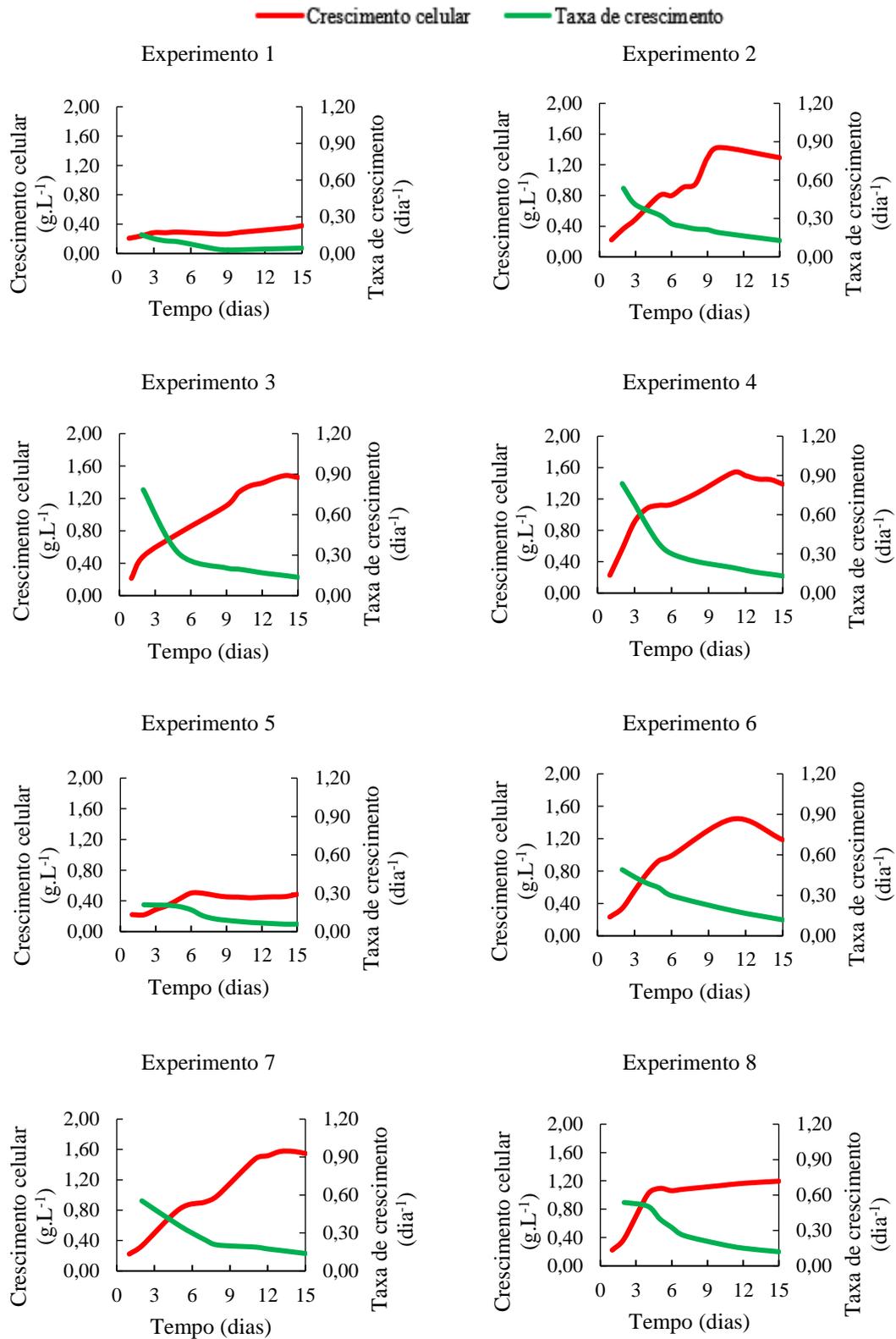


Fonte: Autora.

Nota-se que, embora o Experimento 6 obteve maior taxa de crescimento no 10º dia de cultivo, ao final do período experimental o Experimento 7 foi o que obteve maior concentração celular. Este foi composto por nível alto de iluminação, aeração, glicose e sacarose, e nível baixo de fluconazol e mel.

Os parâmetros cinéticos de cada experimento podem ser observados no APÊNDICE 1. A taxa de crescimento e concentração de células durante a fase de crescimento exponencial dos experimentos realizados podem ser observados na Figura 31.

Figura 31 - Produção celular e taxa de crescimento da microalga *C. minutissima* durante a fase de crescimento exponencial dos Experimentos 1 a 8.



Fonte: Autora.

Analisando os parâmetros cinéticos dos cultivos, foi possível notar que a taxa de crescimento celular nos experimentos foi decrescente ao longo dos dias de cultivo e que o mesmo experimento que obteve maior concentração celular no último dia de cultivo (Experimento 7) foi o mesmo que obteve maior produção celular também ao final do período de cultivo.

Embora a aeração estimule a reprodução celular (PALUDO, 2012), este fator não interferiu na produção da microalga *C. minutissima* pelo fato de o cultivo ser suplementado com glicose, uma fonte de carbono orgânica que estimula o crescimento das microalgas quando inserida como suplemento em cultivos mixotróficos (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004; MARQUEZ *et al.*, 1993).

Na Figura 32 nota-se os fotobiorreatores no último dia de cultivo (15º dia). A diferença da coloração dos meios de cultivo é perceptível e é resultado da concentração celular em cada fotobiorreator e da produção de clorofila pela microalga.

Figura 32 - Sistema de fotobiorreatores em duplicata.



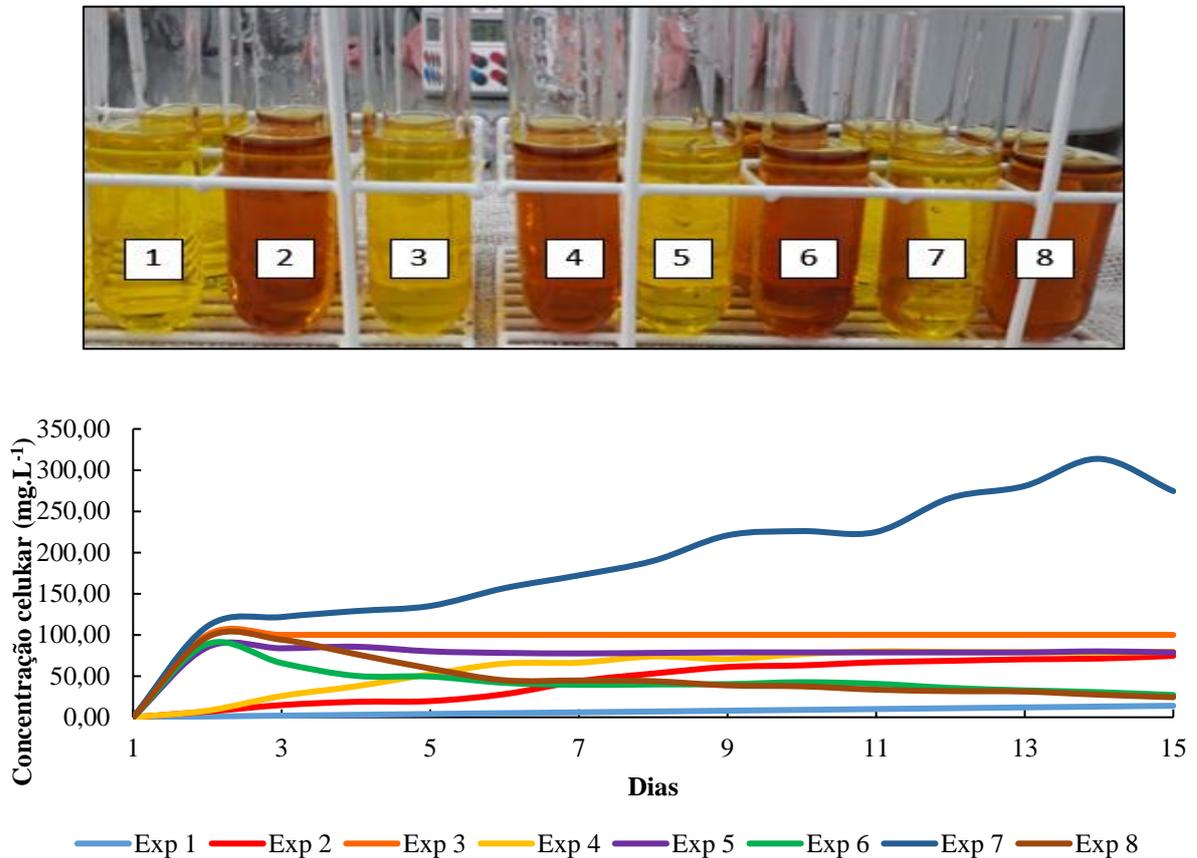
Fonte: Autora.

#### 4.3.2 Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS

O mel apresentou concentração de açúcares redutores igual a  $0,52 \text{ g.L}^{-1}$ . A Figura 33, ilustra a quantificação de açúcares redutores (após 15 dias de cultivo) em cada experimento,

indicando que, quanto mais claro for o líquido do teste de DNS, menor é a quantidade de açúcares redutores no experimento, ou seja, as células microalgais consumiram maior quantidade de açúcares redutores contidos no meio de cultivo.

Figura 33 - Tubos de ensaio com teste de DNS e curva de consumo de açúcares redutores (AR) em cada experimento.



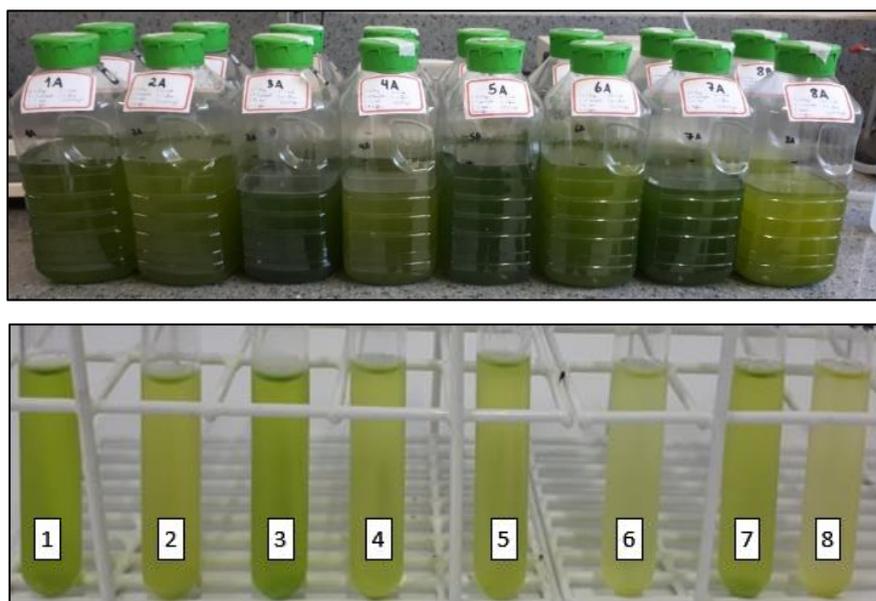
Fonte: Autora.

O maior consumo de açúcares redutores foi observado no Experimento 7, o qual também obteve maior taxa de crescimento celular. Os resultados indicam que a microalga utilizou a glicose ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) adicionada ao meio de cultivo como fonte de carbono orgânico. De acordo com Grobellar (2003), o cultivo heterotrófico é o segundo melhor meio de nutrição para a microalga (perdendo apenas para o cultivo mixotrófico), devido à presença de componentes orgânicos que servem como fonte de energia.

### 4.3.3 Determinação da concentração de clorofila *a* e clorofila *b*

A diferença da produção de pigmentos fotossintetizantes, ou seja, de clorofilas, ao final do período de cultivo pode ser observada na Figura 34a e, na Figura 34b observam-se tubos de ensaio contendo amostras pigmentares extraídas dos respectivos experimentos.

Figura 34 - Experimentos ao final do cultivo (15° dia) (a) e tubos de ensaio após o tempo de extração de clorofila (b).



Fonte: Autora.

Na Tabela 12, observa-se a quantificação (em  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de biomassa, clorofila *a* e clorofila *b* presente em cada experimento.

Tabela 12 - Concentração de biomassa, clorofila *a* e clorofila *b* no 15° dia de cultivo.

Experimentos	Concentração de biomassa ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Concentração de clorofila <i>a</i> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Concentração de clorofila <i>b</i> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
1	$37,9 \pm 0,42$	$7,87 \pm 0,22$	$2,22 \pm 0,25$
2	$129,3 \pm 1,26$	$9,43 \pm 1,21$	$11,40 \pm 0,52$
3	$145,9 \pm 3,79$	$5,59 \pm 1,28$	$13,34 \pm 7,54$
4	$138,9 \pm 3,79$	$8,47 \pm 3,30$	$2,85 \pm 1,43$
5	$48,6 \pm 1,26$	$6,00 \pm 1,41$	$2,95 \pm 2,64$
6	$118,5 \pm 3,79$	$4,78 \pm 2,40$	$1,08 \pm 1,19$
7	$154,7 \pm 2,53$	$9,30 \pm 2,16$	$7,32 \pm 3,50$
8	$119,5 \pm 2,53$	$5,64 \pm 0,17$	$2,67 \pm 1,00$

Fonte: Autora.

Comparando os resultados obtidos na concentração de biomassa e nas concentrações de clorofilas, pode-se dizer, de acordo com Ores *et al.* (2013), que a quantidade de biomassa não interfere no valor de clorofila. Nota-se também que a concentração de clorofila *b* (Experimento 3) extraída da microalga *C. minutissima* foi maior do que a concentração de clorofila *a* (Experimento 2) extraída no 15º dia do período experimental, embora a média de clorofila *a* (7,13 mg.L<sup>-1</sup>) seja maior do que a média de clorofila *b* (5,47 mg.L<sup>-1</sup>).

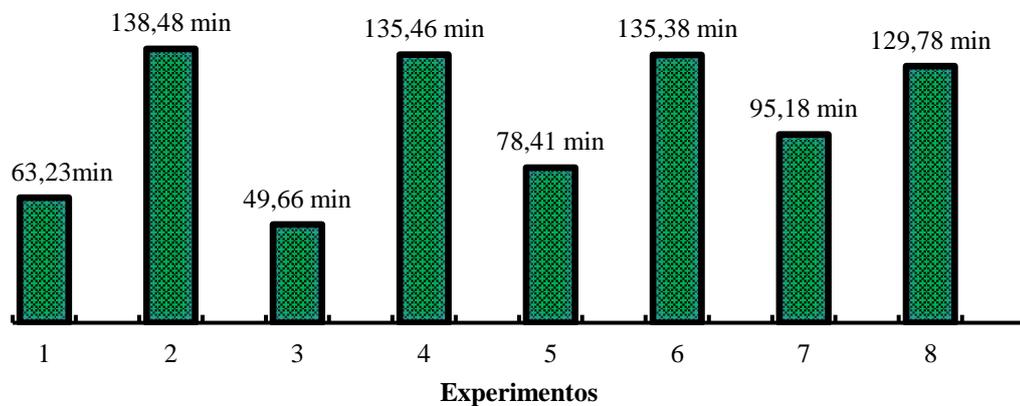
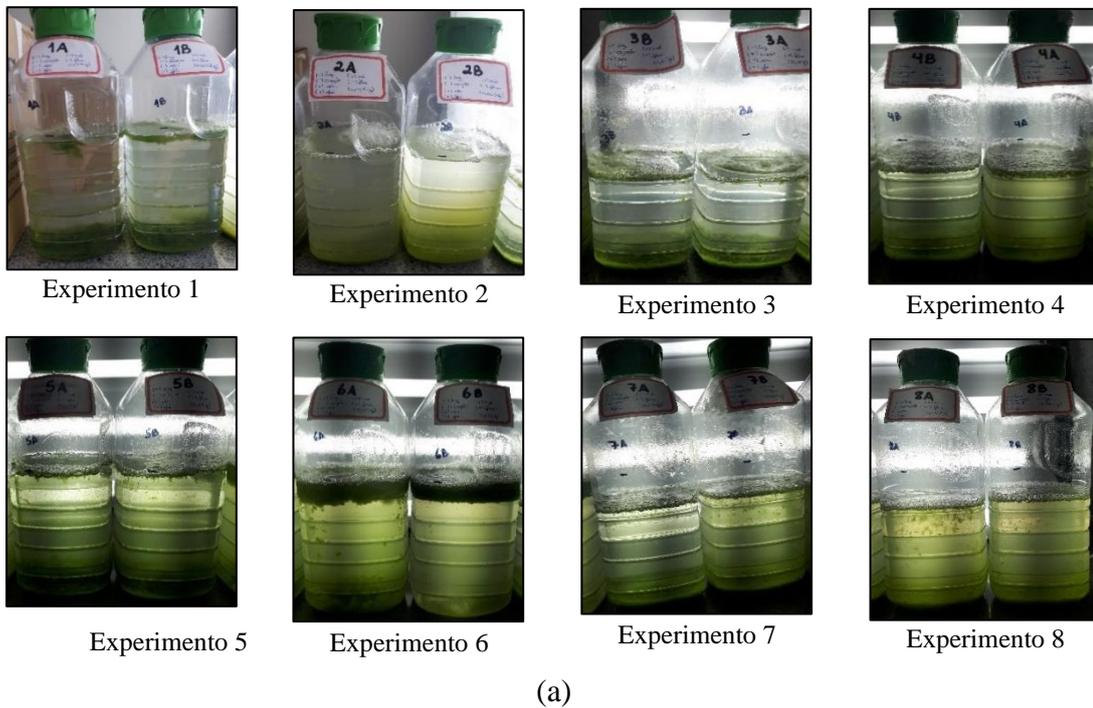
A produção em mg.L<sup>-1</sup> de clorofila *a* foi observada nos experimentos 2 > 7 > 4 > 1 > 8 > 3 > 5 > 6, e de clorofila *b* nos experimentos 3 > 2 > 7 > 5 > 4 > 8 > 1 > 6. Portanto, o Experimento 2 apresentou maior concentração de clorofila *a* (9,43 mg.L<sup>-1</sup>) e o Experimento 3 de clorofila *b* (13,34 mg.L<sup>-1</sup>). Os dois experimentos foram realizados com iluminação em nível baixo (120 µmol/m<sup>2</sup>s).

De acordo com Calijuri *et al.* (2006), pode ocorrer a fotoinibição dos pigmentos fotossintetizantes, ou seja, a fotodestruição ou oxidação destes pigmentos quando as microalgas são expostas em altas concentrações de energia luminosa, justificando a maior produção de clorofila em menor quantidade de iluminação. Portanto, a baixa intensidade luminosa permitiu a maior produção de clorofila.

#### **4.3.4 Obtenção da biomassa**

Durante o processo de floculação (Figura 35a), foi registrado o tempo (em minutos) de floculação total da biomassa de cada experimento, sendo possível observar os dados na Figura 35b.

Figura 35 - Biomassa dos experimentos em processo de floculação (a) e tempo de floculação total da biomassa (b).

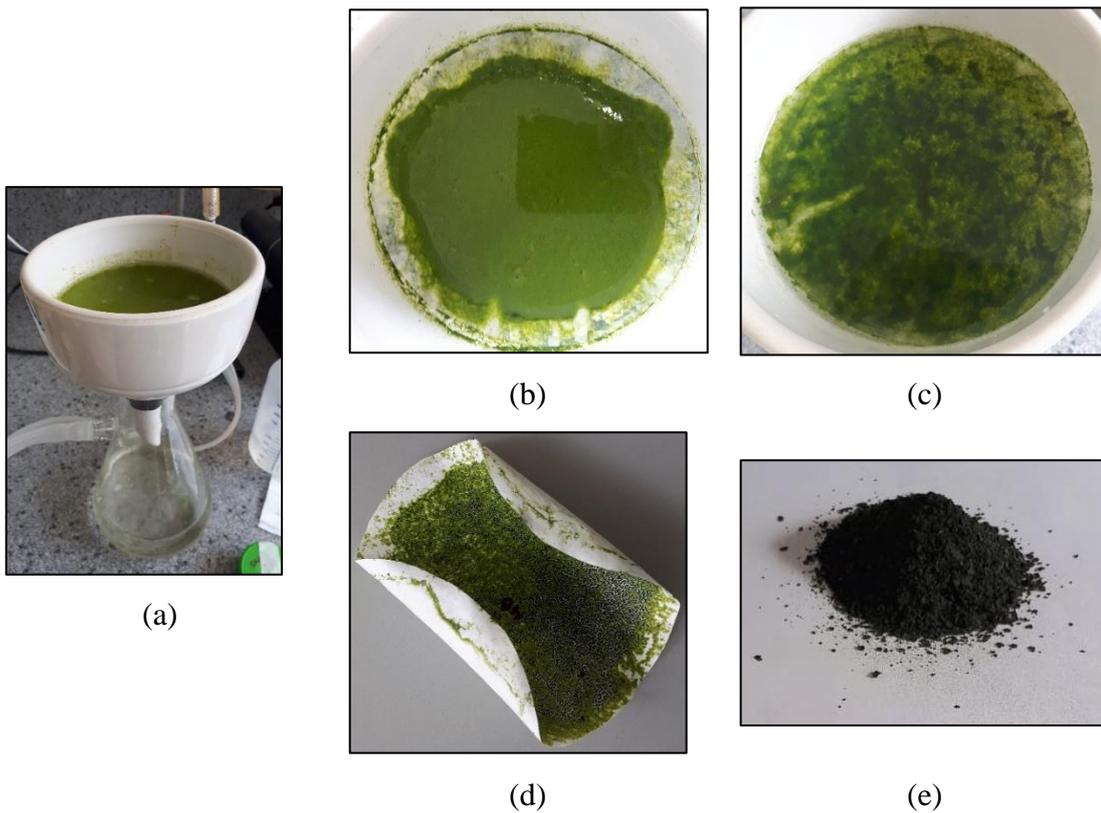


Fonte: Autora.

Como os experimentos foram compostos por concentrações em nível baixo (1) e em nível alto (2) de cada fator analisado, estes obtiveram tempos de floculação diferentes, sugerindo que a composição do Experimento 3 (iluminação, aeração e fluconazol em nível baixo e mel, glicose e sacarose em nível alto) favoreceu o menor tempo de floculação, podendo-se afirmar que a quantidade de biomassa não interfere no tempo de floculação da microalga.

Após o processo de floculação total da biomassa contida nos experimentos, estes foram submetidos ao processo de filtração a vácuo para separar as células do meio de cultivo (Figura 36).

Figura 36 - Processo de filtração e de secagem de biomassa: (a) filtração a vácuo, (b) Biomassa úmida, (c) Biomassa em processo de secagem, (d) Biomassa seca e (e) Biomassa recuperada no processo de raspagem do filtro.



Fonte: Autora.

Os valores de peso seco (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) obtidos da biomassa de cada experimentos podem ser observados na Tabela 13. Nota-se que o Experimento 6 obteve maior quantidade de biomassa em peso seco; este foi composto por Fluconazol ( $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ), mel e sacarose ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ) e iluminação em nível alto, com a ausência de aeração e glicose.

Tabela 13 - Concentração de biomassa em peso seco obtida em cada experimento.

Experimentos	Concentração de biomassa seca (g.L <sup>-1</sup> )
1	0,64 ± 0,07
2	1,59 ± 0,15
3	1,70 ± 0,04
4	1,88 ± 0,03
5	0,86 ± 0,07
6	2,15 ± 0,02
7	1,72 ± 0,01
8	1,78 ± 0,06

Fonte: Autora.

Pode-se afirmar, então, que a aeração e a glicose são fatores estimulantes para a produção de biomassa de microalgas (BECKER & VENKATARAMAN, 1984; PALUDO, 2012), porém, na ausência destes fatores, o antifúngico Fluconazol, o mel, a sacarose e a iluminação em nível alto são fatores que suprimiram e favoreceram o processo de produção de biomassa da microalga no presente estudo.

O processo de floculação da biomassa da microalga *C. minutissima* com sulfato de alumínio (Al<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> foi eficiente para a separação da biomassa do meio de cultivo. Além disso, este processo pode ser utilizado para o reaproveitamento da água do cultivo (SOUZA *et al.*, 2015).

#### 4.3.5 Comportamento da decomposição térmica (TGA)

As curvas de decomposição térmica da biomassa produzida por cada experimento em atmosfera inerte (nitrogênio) foram determinadas com a TG (termogravimetria), indicando a decomposição da massa em função da temperatura por programação controlada.

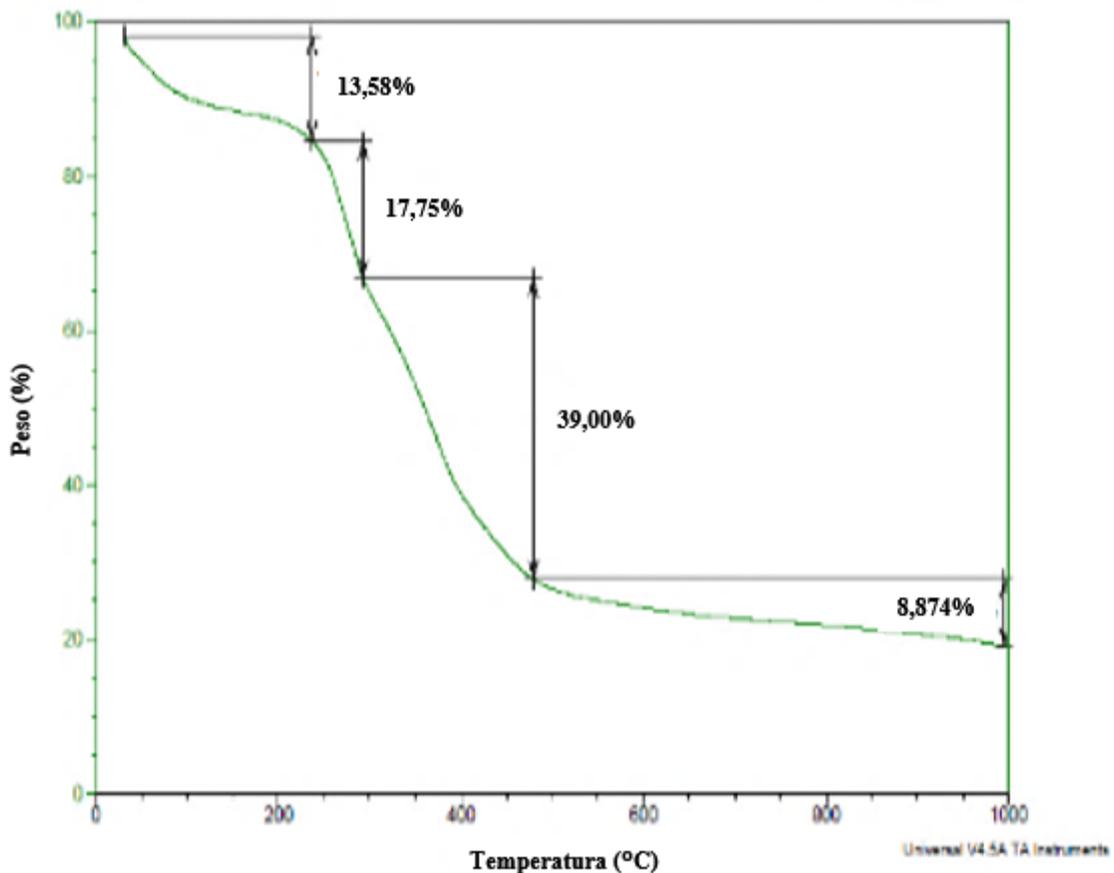
De acordo com Agrawal e Chakraborty (2013) e Chen *et al.* (2011), a degradação da biomassa de microalgas pode ser dividida em três etapas básicas: *i*) entre 25-190°C para a quebra de proteínas e de fosfolipídeos, *ii*) entre 200-450°C para decompor carboidratos e proteínas e *iii*) acima de 450°C para quebrar a cadeia de ácidos graxos.

No APÊNDICE 2 estão as análises termogravimétricas com os respectivos gráficos de degradação da biomassa dos experimentos, onde observa-se que os experimentos obtiveram

variados eventos de decomposição térmica diferidos pela temperatura (em °C), os quais estão relacionados com a perda de umidade e degradação térmica da biomassa.

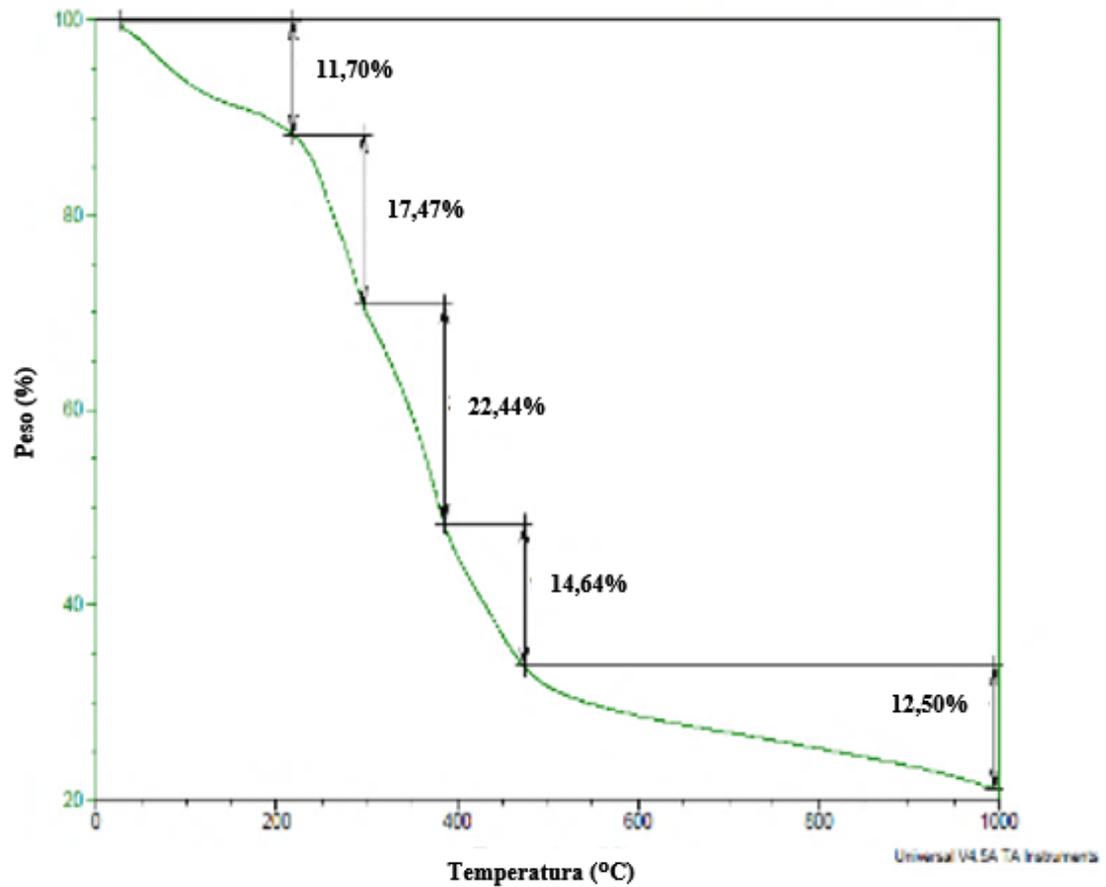
No entanto, é notável que nenhum dos experimentos apresentou biomassa 100% queimada ao final da TGA. Contudo, ao comparar todos os experimentos realizados, no Experimento 2 foi observado a segunda maior queima de biomassa (78,98%), o que pode haver relação com as fontes de carbono orgânico (mel, glicose e sacarose) adicionadas ao cultivo, enquanto a biomassa do Experimento 8 foi a que mais degradou durante a TGA. Portanto, as condições de cultivo com os fatores luz, aeração e mel em nível alto, e fluconazol, glicose e sacarose em nível baixo, contribuíram para a queima de maior porcentagem (81,75%) de biomassa. A curva de degradação da biomassa do Experimento 2 pode ser observada na Figura 37 e a do Experimento 8 está ilustrada na Figura 38.

Figura 37 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 2.



Fonte: Autora.

Figura 38 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 8.



Fonte: Autora.

#### 4.3.6 Método de Taguchi

O método de Taguchi foi utilizado para determinar o melhor ajuste do processo de cultivo da microalga *C. minutissima* sob as seguintes variáveis respostas: (i) crescimento celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ), (ii) clorofila *a* ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e (iii) tempo de floculação da biomassa (minutos).

##### 4.3.6.1 Crescimento celular

A Tabela 14 representa a matriz  $L_8$  do método de Taguchi com as variáveis codificadas e decodificadas, contendo também os valores (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) da variável resposta “crescimento celular”.

Tabela 14 - Matriz  $L_8$  com as variáveis decodificadas e resultado do crescimento celular ao final do período de cultivo.

Exp	Variáveis decodificadas						g.L <sup>-1</sup>
	Luz ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	Aer	Fluc (g.L <sup>-1</sup> )	Mel (mL)	Gli (mL)	Sac (mL)	
1	120	Is	0,005	Is	Is	Is	0,38 $\pm$ 0,42
2	120	Is	0,005	1	1	1	1,29 $\pm$ 1,26
3	120	Bor	0,01	Is	Is	1	1,46 $\pm$ 3,79
4	120	Bor	0,01	1	1	Is	1,39 $\pm$ 3,79
5	180	Is	0,01	Is	1	Is	0,49 $\pm$ 1,26
6	180	Is	0,1	1	Is	1	1,19 $\pm$ 3,79
7	180	Bor	0,005	Is	1	1	1,55 $\pm$ 2,53
8	180	Bor	0,005	1	Is	Is	1,20 $\pm$ 2,53

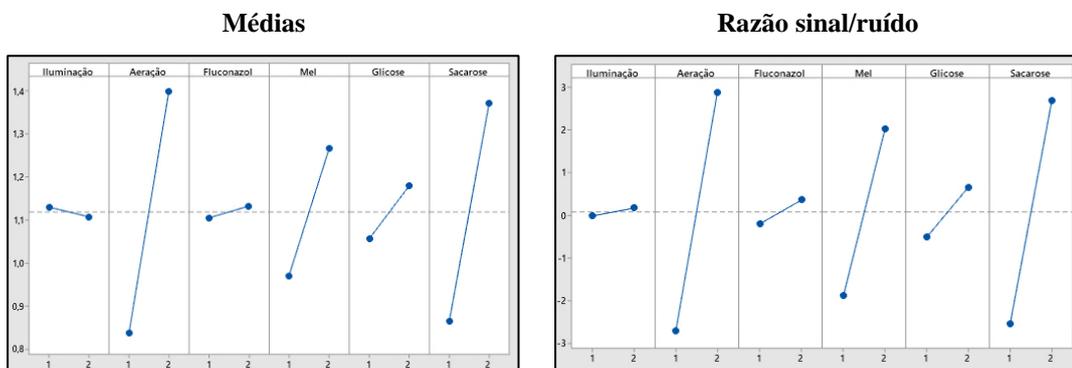
**Exp:** Experimento; **Aer:** Aeração; **Fluc:** Fluconazol; **Gli:** Glicose; **Sac:** Sacarose; **Is:** Isento; **Bor:** Borbulhamento.

Fonte: Autora.

Observa-se que a ordem dos experimentos que obtiveram maior crescimento celular foi:  $7 > 5 > 3 > 4 > 1 > 2 > 8 > 6$ . Os Experimentos 7 e 5 apresentaram maior crescimento celular; estes foram compostos, em semelhança, de glicose (1mL/L) e iluminação a  $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

A Figura 39 ilustra os efeitos, em relação à média e à razão S/N, que cada fator exerce sobre a variável resposta “crescimento celular”. Observa-se que os fatores aeração, mel, glicose e sacarose têm melhor ajuste em nível alto. Os fatores iluminação e concentração do antifúngico Fluconazol não se manifestaram significativos em relação ao nível de uso.

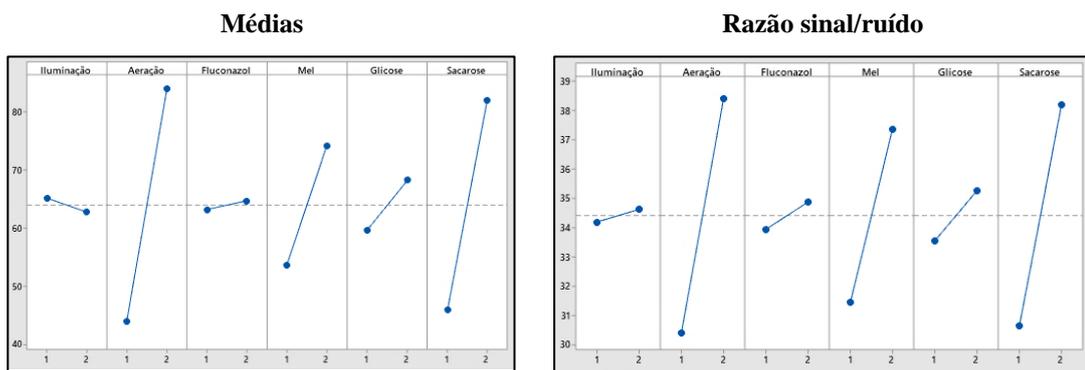
Figura 39 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob o crescimento celular.



Fonte: Minitab® 19 (2020).

Como mencionado anteriormente, as condições de cultivo do Experimento 7 resultaram em maior concentração celular, assim como maior produção celular; portanto, resultados semelhantes foram encontrados durante a análise gráfica da produção celular (Figura 40), justificando a importância de cada fator analisado neste estudo.

Figura 40 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob a produção celular.



Fonte: Minitab® 19 (2020).

A ANOVA, foi realizada para considerar os fatores de maior influência (significância estatisticamente comprovada) no processo de crescimento celular da microalga *C. minutissima* (Tabela 15).

Tabela 15 - Análises de variância do crescimento celular em relação à média e à razão S/N.

Fonte	ANOVA (médias)					ANOVA (S/N)				
	SQ	GL	SMQ	F	P	SQ	GL	SMQ	F	P
Iluminação	0,00101	1	0,00101	1,65	0,42	0,07	1	0,07	0,45	0,62
Aeração	0,63281	1	0,63281	1033,16	0,02	62,80	1	62,80	405,70	0,03
Fluconazol	0,00151	1	0,00151	2,47	0,36	0,64	1	0,64	4,14	0,29
Mel	0,17701	1	0,17701	289,00	0,03	30,70	1	30,70	198,36	0,04
Glicose	0,03001	1	0,03001	49,00	0,09	2,76	1	2,76	17,88	0,14
Sacarse	0,51511	1	0,51511	841,00	0,02	54,98	1	54,98	355,17	0,03
Erro	0,00061	1	0,00061	-	-	0,15	1	0,15	-	-

Fonte: Autora.

De acordo com a ANOVA, os fatores aeração, mel e sacarose mostraram-se significantes na análise dos limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor com  $F_{tab} \geq 161,4$  e  $p \geq 5\%$ . Estes mesmos fatores são melhores ajustados em nível alto. Embora o

Fluconazol e a glicose não se mostraram significantes, ainda são relevantes neste processo com  $F_{calc} \geq 2$  (PADKE, 1989) e melhores ajustados em nível alto.

Com base nos resultados obtidos na ANOVA, pode-se afirmar com 95% de confiança que os fatores aeração, mel e sacarose foram significantes para quando no que diz respeito ao aumento do crescimento celular. Estes fatores, quando adicionados em cultivos de microalgas, beneficia a produção de células (GROBBELAAR, 2003).

O carbono orgânico adicionado ao meio de cultivo de microalgas propõe maior taxa de crescimento quando comparada à utilização de carbono inorgânico por vias fotossintéticas (OLIVER, 2014). De acordo com Ren (2016), quando submetidas à fonte de carbono orgânica inserida no meio de cultivo, as microalgas apresentam crescimento celular elevado, assim como o metabolismo respiratório. Este fato justifica a significância do mel, da glicose e da sacarose para a variável resposta “crescimento celular”.

#### 4.3.6.2 Tempo de floculação da biomassa

Com os resultados da Tabela 16 e assistência do software Minitab® 19 foi plausível a elaboração da Figura 41, na qual são ilustrados os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta “tempo de floculação da biomassa” (minutos), sendo esta análise em relação à média das réplicas.

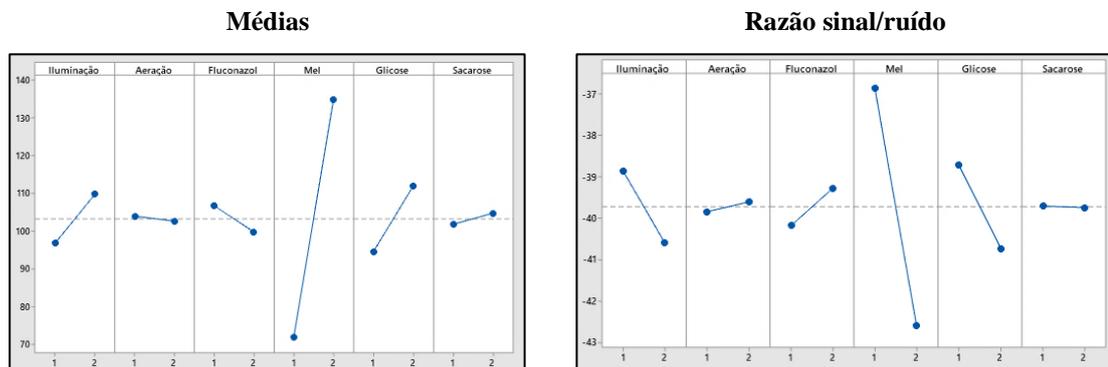
Tabela 16 - Matriz  $L_8$  com as variáveis decodificadas e resultado do tempo de floculação da biomassa dos cultivos.

Exp	Variáveis decodificadas						Tempo de floculação (minutos)
	Luz ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )	Aer	Fluc ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Mel (mL)	Gli (mL)	Sac (mL)	
1	120	Is	0,005	Is	Is	Is	63,23 $\pm$ 1,51
2	120	Is	0,005	1	1	1	138,48 $\pm$ 2,76
3	120	Bor	0,01	Is	Is	1	49,66 $\pm$ 2,02
4	120	Bor	0,01	1	1	Is	135,46 $\pm$ 4,07
5	180	Is	0,01	Is	1	Is	78,41 $\pm$ 2,64
6	180	Is	0,01	1	Is	1	135,38 $\pm$ 2,56
7	180	Bor	0,005	Is	1	1	95,18 $\pm$ 5,73
8	180	Bor	0,005	1	Is	Is	129,78 $\pm$ 4,91

**Exp:** Experimento; **Aer:** Aeração; **Fluc:** Fluconazol; **Gli:** Glicose; **Sac:** Sacarose; **Is:** Isento; **Bor:** Borbulhamento.

Fonte: Autora.

Figura 41 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob o tempo de floculação da biomassa.



Fonte: Minitab® 19 (2020).

Observa-se que o Experimento 3 apresentou menor tempo de floculação (49,66 minutos). Pode-se dizer também que os fatores iluminação, mel e glicose possuem melhor ajuste em nível alto, enquanto o fator Fluconazol é melhor ajustado em nível baixo. Os fatores aeração e sacarose não se manifestaram significativos em relação ao nível de uso.

Contudo, para analisar quais fatores possuem maior influência (significância estatisticamente comprovada) no processo de floculação da biomassa da microalga *C. minutissima* com sulfato de alumínio  $(Al_2SO_4)_3$ , perpetrou-se a ANOVA, com grau de confiança de cada fator determinado por meio do teste F (Tabela 17), podendo-se notar que os fatores iluminação, mel e glicose apresentaram-se relevantes com  $F_{calc} \geq 2$  (PADKE, 1989), embora o mel tenha se manifestado o fator de maior relevância para esta variável resposta, podendo-se supor que este fator, quando inserido em meio de cultivo de microalgas, promove a aglutinação das células, fazendo-as decantarem mais rápido.

Tabela 17 - Análises de variância do tempo de floculação da biomassa microalgal em relação à média e à razão S/N.

Fonte	ANOVA (médias)					ANOVA (S/N)				
	SQ	GL	SMQ	F	p	SQ	GL	SMQ	F	p
Iluminação	336,96	1	336,96	2,49	0,36	6,03	1	6,03	3,09	0,32
Aeração	3,67	1	3,67	0,03	0,89	0,11	1	0,11	0,06	0,84
Fluconazol	96,33	1	96,33	0,71	0,55	1,62	1	1,62	0,83	0,53
Mel	7977,11	1	7977,11	58,89	0,08	65,90	1	65,90	33,67	0,10
Glicose	603,43	1	603,43	4,45	0,28	8,17	1	8,17	4,18	0,29
Sacarose	17,46	1	17,46	0,13	0,78	0,002	1	0,002	0	0,97
Erro	135,47	1	135,47	-	-	1,95	1	1,95	-	-

Fonte: Autora.

Em relação aos outros experimentos, os Experimentos 3 e 7 floclaram em menor tempo, assim como obtiveram maior concentração de biomassa; estes foram compostos por aeração e sacarose em nível alto, podendo-se afirmar que a maior concentração de biomassa favoreceu o menor tempo de floclação. A concentração de biomassa no meio de cultivo também afeta o processo de floclação da biomassa de microalgas utilizando sulfato de alumínio (Al<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (HESSE-BIBER & JOHNSON, 2015).

#### 4.3.6.3 Clorofila *a*

A Tabela 18 representa a matriz L<sub>8</sub> do método de Taguchi com as variáveis codificadas e decodificadas, contendo também os valores (em mg.L<sup>-1</sup>) da variável resposta “concentração de clorofila *a*”.

Tabela 18 - Matriz L<sub>8</sub> com as variáveis decodificadas e resultado da concentração de clorofila *a* ao final do período de cultivo.

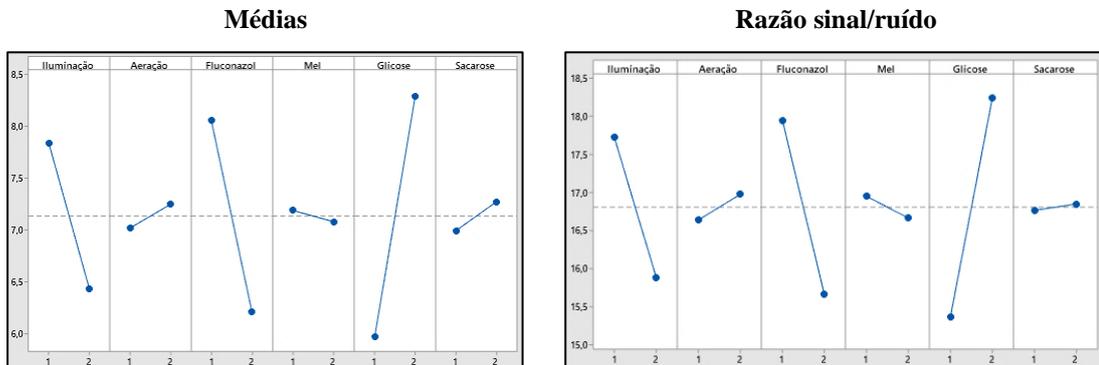
Exp	Variáveis decodificadas						mg.L <sup>-1</sup>
	Luz (μmol/m <sup>2</sup> s)	Aer	Fluc (g.L <sup>-1</sup> )	Mel (mL)	Gli (mL)	Sac (mL)	
1	120	Is	0,005	Is	Is	Is	7,87 ± 0,22
2	120	Is	0,005	1	1	1	9,43 ± 1,21
3	120	Bor	0,01	Is	Is	1	5,59 ± 1,28
4	120	Bor	0,01	1	1	Is	8,47 ± 3,30
5	180	Is	0,01	Is	1	Is	6,00 ± 1,41
6	180	Is	0,01	1	Is	1	4,78 ± 2,40
7	180	Bor	0,005	Is	1	1	9,30 ± 2,16
8	180	Bor	0,005	1	Is	Is	5,64 ± 0,17

**Exp:** Experimento; **Aer:** Aeração; **Fluc:** Fluconazol; **Gli:** Glicose; **Sac:** Sacarose; **Is:** Isento; **Bor:** Borbulhamento.

Fonte: Autora.

Nota-se que a condição do Experimento 2 (120 μmol/m<sup>2</sup>s, sem aeração, 0,005 g.L<sup>-1</sup> de fluconazol, adição de mel, glicose e sacarose) favoreceu a produção de clorofila *a*. A Figura 42 ilustra os gráficos dos efeitos de cada fator sobre a média e sobre a razão S/N.

Figura 42 - Efeito dos fatores sobre a média e sobre a razão S/N sob a produção de clorofila *a*.



Fonte: Minitab® 19 (2020).

Pode-se notar que a iluminação e o Fluconazol são melhores ajustados em nível baixo, e a glicose é melhor ajustada em nível alto. A aeração e a sacarose não se mostraram fatores relevantes neste processo, porém são bem ajustados em nível alto e o mel em nível baixo. Na Tabela 19 pode-se observar a ANOVA da produção de clorofila *a* em relação média.

Tabela 19 - Análises de variância da produção de clorofila *a* em relação à média e à razão S/N.

Fonte	ANOVA (médias)					ANOVA (S/N)				
	SQ	GL	SMQ	F	p	SQ	GL	SMQ	F	p
Iluminação	3,97	1	3,97	2,25	0,37	6,78	1	6,78	2,79	0,34
Aeração	0,10	1	0,10	0,06	0,84	0,22	1	0,22	0,09	0,81
Fluconazol	6,84	1	6,84	3,87	0,29	10,45	1	10,45	4,31	0,28
Mel	0,02	1	0,02	0,01	0,92	0,16	1	0,16	0,07	0,83
Glicose	10,85	1	10,85	6,14	0,24	16,52	1	16,52	6,80	0,23
Sacarose	0,15	1	0,15	0,09	0,81	0,01	1	0,01	0,01	0,95
Erro	1,76	1	1,76	-	-	2,42	1	2,42	-	-

Fonte: Autora.

Nota-se que nenhum fator se mostrou estatisticamente significativo, porém, com  $F_{calc} \geq 2$ , a iluminação, o Fluconazol e a glicose são relevantes para o aumento da concentração de clorofila *a* no cultivo da microalga *C. minutissima* (PADKE, 1989).

Ores *et al.* (2013) analisaram o teor de clorofila *a* da microalga *Dunaliella tertiolecta* em meio Conway sob aeração constante e fotoperíodo de 12h, na qual a pesquisa obteve uma média de 30,53 mg.L<sup>-1</sup> de clorofila *a*. Outro estudo realizou pesquisas com a microalga

*Chlorella vulgaris* cultivada em meio BG11 suplementado com  $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$  de vitaminas (cianocobalamina:  $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ , HCl tiamina:  $2 \text{ g.L}^{-1}$  e Biotina:  $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ ) obtendo cerca de  $11 \text{ mg.L}^{-1}$  de clorofila total extraída dos cultivos (CHINNASAMY *et al.*, 2010).

Os valores de clorofila obtidos por estes autores são maiores do que a média obtida neste estudo ( $7,13 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Estes autores também afirmam que a concentração de células no meio de cultivo não interfere na produção de clorofila, pois os maiores teores de clorofila *a* foram encontrados em concentrações menores de células ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Este fato pode ser observado no presente estudo, onde a maior produção de clorofila *a* ( $9,43 \text{ mg.L}^{-1}$ ) não foi obtida no experimento com maior concentração celular.

Simões *et al.* (2019) cultivaram a mesma microalga em condições semelhantes: iluminação horizontal em ciclo de 24h e meio de cultivo F/2; porém sem a adição de fontes de carbono orgânico e nem o antifúngico fluconazol ao meio de cultivo. Os autores obtiveram uma taxa muito inferior de clorofila *a* quando comparada ao presente estudo ( $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$ ) fato que os próprios autores explicam devido a produção de clorofila poder variar conforme as condições submetidas ao cultivo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Efetuuou-se um extenso trabalho experimental, no qual os resultados obtidos foram altamente satisfatórios sendo possível responder às questões de pesquisa:

- A produção de microalgas cultivadas com o antifúngico Fluconazol tem rendimento em larga escala?

A produção de microalgas nas condições cultivadas apresenta 1,55 g.L<sup>-1</sup>; este ainda é um valor muito baixo para ser considerado viável para a produção de biomassa em larga escala.

- O antifúngico Fluconazol previne a contaminação por fungos no cultivo de microalgas?

O Fluconazol, embora seja pouco relevante nas variáveis respostas estudadas, não possui ação inibitória no crescimento da microalga *C. minutissima*, pois o mesmo pode ser ajustado em nível alto para melhor ajuste do processo.

- O princípio ativo farmacêutico (antifúngico Fluconazol) tem ação inibitória no crescimento da microalga?

O antifúngico Fluconazol previne a contaminação por fungos no cultivo, além de não causar a degradação de clorofila ao interagir com o antibiótico Ceftriaxona sódica.

- O método de Taguchi auxilia na identificação do melhor ajuste das variáveis respostas e dos principais fatores influentes no cultivo?

O método de Taguchi auxiliou a identificar o melhor ajuste dos fatores para as variáveis respostas estudadas.

## 6 CONCLUSÕES

Mediante à avaliação do potencial biotecnológico das microalgas sob as variáveis respostas dos experimentos realizados, foi possível concluir que:

- A aeração e o mel podem ser considerados fontes de carbono estimulantes para o crescimento da microalga. Em relação à produção de clorofila *a*, conclui-se que o cultivo realizado em condição heterotrófica proporcionou maior produção de clorofila *a* pela microalga *C. minutissima* quando comparado ao realizado em condição fotoheterotrófica.
- A adição dos antibióticos Sulfametoxazol e Trimetoprima combinados com os demais fatores (nitrato e aeração) apresentou efeito positivo na produção de biomassa. Foi observada produção de clorofila, com destaque para a produção de clorofila *b* em relação à clorofila *a*. Ainda, os cultivos apresentaram coloração verde e marrom, indicando uma possível degradação destes pigmentos.
- A presença do antifúngico Fluconazol não inibiu o crescimento celular, porém, proporcionou a produção de células, podendo este ser utilizado em cultivos de larga escala para obtenção de biomassa. Além disso, a presença deste fármaco nos meios de cultivos preveniu a contaminação por fungos.
- O método de Taguchi auxiliou na identificação do melhor ajuste das variáveis respostas: (i) crescimento celular, (ii) tempo de floculação da biomassa e (iii) produção de clorofila *a*, assim como na identificação dos principais fatores influentes nos cultivos.
- A presença do antifúngico Fluconazol nos meios de cultivo não interferiu, positivamente como negativamente, nas variáveis respostas estudadas. Porém, os cultivos heterotróficos (com adição de fontes de carbono orgânica e inorgânica) proporcionaram maior produção de biomassa da microalga *C. minutissima*, podendo-se concluir que, de acordo com a ANOVA, os fatores aeração, mel e sacarose são mais significantes sob esta variável resposta.

- O processo de floculação da biomassa da microalga *C. minutissima* com sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2\text{SO}_4$ )<sub>3</sub> foi eficiente para a separação da biomassa do meio de cultivo e, de acordo com a ANOVA, a iluminação e o mel são os fatores mais relevantes para esta variável resposta, podendo-se supor que estes, quando inseridos em meio de cultivo de microalgas, promovem a aglutinação das células, fazendo-as decantarem mais rápido.
- A concentração da biomassa no meio de cultivo também afeta o processo de floculação celular com sulfato de alumínio, pois os cultivos que apresentaram menor tempo de floculação obtiveram maior concentração de biomassa nos fotobiorreatores.
- A maior produção de clorofila *a* foi observada em cultivos submetidos em nível baixo de iluminação, podendo-se concluir que, quando expostas em nível alto de iluminação, as microalgas sofrem o processo de fotoinibição. Pode-se também dizer que tanto a iluminação e o Fluconazol não são fatores relevantes para a produção de clorofila *a* pela microalga *C. minutissima* quando o cultivo é exposto às concentrações de carbono orgânico e inorgânico.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar o método de Taguchi para analisar o cultivo da microalga *C. minutissima* em presença do antifúngico Fluconazol juntamente com o antibiótico Ceftriaxona sódica;
- Melhorar o sistema de floculação da biomassa produzida pela microalga *C. minutissima* nas condições sugeridas por este estudo para que o processo seja realizado mais rápido;
- Analisar e aprimorar o processo de produção de clorofila *b* fazendo-se uso dos métodos do Delineamento Experimental;
- Aplicar o método da Superfície de Resposta sob as variáveis respostas estudadas, a fim de obter o caminho ascendente, atingindo o experimento rotacional.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.; CHAKRABORTY, S. A kinetic study of pyrolysis and combustion of microalgae *Chlorella vulgaris* using thermos-gravimetric analysis. **Bioresource Technology**, Trivandrum - India, v. 128, p. 72-80, 2013.
- ALI, S. M.; ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Spectroscopic methods for analysis of cephalosporins in pharmaceutical formulations. **World Journal of Analytical Chemistry**, Newark - NJ, v. 3, n. 1A, p. 21-32, 2015.
- ALVES, M. S. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. 2005. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2005.
- ALVES, D. F. S.; CABRAL JÚNIOR, F. D. C.; CABRAL, P. P. D. A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. M. D.; REGO, A. C. M. D.; MEDEIROS, A. C. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro - RJ, v. 35, n. 3, p. 188-93, maio/jun. 2008.
- AMARAL, M. S.; LOURES, C. C.; RÓS, P.; MACHADO, S. A.; REIS, C. E.; DE CASTRO, H. F.; SILVA, M. B. Evaluation of the cultivation conditions of marine microalgae *Chlorella* sp. to be used as feedstock in ultrasound-assisted ethanolysis. **Biofuel Research Journal**, New Brunswick - Canada, v. 2, n. 3, p. 288-294, 2015.
- AMARAL, R. L.; SILVA, D. D. C.; CARVALHO, M. N.; DA MOTTA SOBRINHO, M. A. Processo contínuo de remoção de compostos orgânicos não iônicos de efluentes líquidos gerados em refinarias de petróleo por adsorção em argilas organicamente modificadas. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia - MG. **Anais [...]**. Editora: Docsity, 2009.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras - MG, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- ARANDA, M. H.; JUNG, C. F.; TEN CATEN, C. S. Aplicação do projeto de experimentos para otimização de uma inovação tecnológica. **Revista Gestão Industrial**, Ponta Grossa, PR, v. 4, n. 2, p. 116-132, 2008.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Specification D6751-15cel**: standard specification for biodiesel fuel blend stock (b100) for middle distillate fuels. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2015.
- BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. **Biomass**, London - England, v. 4, n. 2, p. 105-125, 1984.
- BECKER, W. 18 Microalgae in human and animal nutrition. *In*: **HANDBOOK of microalgal culture**: biotechnology and applied phycology. Ames - Iowa, USA: Amos Richmond, 2004. 312 p.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba - PR, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

- BOLTON, J. R.; HALL, DAVID O. The maximum efficiency of photosynthesis. **Photochemistry and Photobiology**, Sherbrooke - Canada, v. 53, n. 4, p. 545-548, 1991.
- BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- BRASIL, B. S. A. F.; COSTA, L. Agroenergia em revista: microalgas. **Embrapa Agroenergia**: Outras publicações técnicas (INFOTECA-E), Brasília - DF, v. 10, 2016.
- 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**, Dublin - Ireland, v. 14, n. 2, p. 557-577, 1 fev. 2010.
- BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 88 p. (apostila).
- CARPENTER, S. R.; CARACO, N. F.; CORRELL, D. L.; HOWARTH, R. W.; SHARPLEY, A. N.; SMITH, V. H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological applications**, California - USA, v. 8, n. 3, p. 559-568, 1998.
- CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.
- CHEN, C.; MA, X.; LIU, K. Thermogravimetric analysis of microalgae combustion under different oxygen supply concentrations. **Applied Energy**, London - England, v. 88, p. 3189-3196, 2011.
- CHENG, Y.; LU, Y.; GAO, C.; WU, Q. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. **Energy & Fuels**, Newark - USA, v. 23, n. 8, p. 4166-4173, 2009.
- CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 101, n. 9, p. 3097-3105, 2010.
- CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. V. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, Limassol - Cyprus, v. 98, p. 64-71, 2016.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in biotechnology**, Cambridge - USA, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- CHO, S. LUONG; T. T., LEE, D.; OH, Y. K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 102, n. 18, p. 8639-8645, 2011.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, Facundo-Joaquin. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae.

**Biotechnology**, Graz - Austria, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004.

COLOMBO, A. L.; MATTA, D. D.; ALMEIDA, L. P. D.; ROSAS, R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador - BA, v. 6, n. 3, p. 118-123, 2002.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Conversion of radiant light energy in photobioreactors. **AIChE Journal**, New York - USA, v. 40, n. 6, p. 1055-1066, 1994.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C. D.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e nutrição**, Araraquara - SP, v. 17, n. 4, p. 429-436, 2006.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caixias do Sul - RS. **Anais [...]**. Editora: Galoá, 2011.

DALIRY, S.; HALLAJISANI, A.; MOHAMMADI, R. J.; NOURI, H.; GOLZARY, A. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. **Global Journal of Environmental Science and Management**, Tehran - Iran, v. 3, n. 2, p. 217-230, 2017.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: current activities and future developments. **Energy, Conversion and Management**, Irbid - Jordan, v. 50, n. 11, p. 2782-2801, 2009.

DICKINSON, K. E.; WHITNEY, C. G.; MCGINN, P. J. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalgae *Scenedesmus* sp. AMDD. **Algal Research**, Los Alamos - USA, v. 2, n. 2, p. 127-134, 2013.

DOMINGUEZ, Herminia (ed.). **Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals**. Philadelphia, USA: Elsevier, 2013.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro - RJ: Interciência/Finep, 1998.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T. D. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, Araraquara - SP, 2002.

FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. **Farmacopéia Brasileira**. [s.l.: s.n.]. v. 1.

FAROOQ, M. A.; NÓVOA, H.; ARAÚJO, A.; TAVARES, S. M. An innovative approach for planning and execution of pre-experimental runs for Design of Experiments. **European Research on Management and Business Economics**, Vigo - Spain, v. 22, n. 3, p. 155-161, 1 set. 2016.

FERREIRA, C. S. G.; NUNES, B. A.; DE MELO HENRIQUES-ALMEIDA, J. M.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Plymouth - UK, v. 67, n. 3, p. 452-458, 2007.

FICA, A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista chilena de infectología**, Berbarada Morin - Chile, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004.

FRANCISCO, É. C.; FRANCO, T. T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. **Bioprocess and biosystems engineering**, Garching - Germany, v. 37, n. 8, p. 1497-1505, 2014.

GAZZONI, D. L. **Os desafios do biodiesel de algas**. 2014. Disponível em <http://www.gazzoni.eng.br/pagina40.htm>. Acesso em: 20 fev. 2020.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I.; MANSILLA, H. D. Destruction of EDTA using Fenton and photo-Fenton-like reactions under UV-A irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Manchester - UK, v. 167, n. 1, p. 59-67, 2004.

GIBBS, H. K.; JOHNSTON, M.; FOLEY, J. A.; HOLLOWAY, T.; MONFREDA, C.; RAMANKUTTY, N.; ZAKS, D. Carbon payback times for crop-based biofuel expansion in the tropics: the effects of changing yield and technology. **Environmental research letters**, California - USA, v. 3, n. 3, p. 034001, 2008.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. F.; PÉREZ, J. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal of Biotechnology**, Almeria - Spain, v. 45, n. 1, p. 59-69, 1996.

GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition-Mineral Nutrition. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford - UK, Amos Richmond, p. 95-115, 2003.

GROSS, J. Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids. *In*: JEANA GROSS. **Springer Science & Business Media**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351 p.

GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. *I. Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa - ON, v. 8, p. 229-239, 1962.

GUIMARÃES, B. S. **Estudo da cinética de crescimento da Microalga *Scenedesmus* sp. em meios de cultivo salobros**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2016.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: a importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARIDY, S.; GOUDA, S. A.; WU, Z. An integrated framework of statistical process control and design of experiments for optimizing wire electrochemical turning process. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, Middlesex - UK, v.53, n. 1-4, p. 191-207, 2011.

HESSE-BIBER, S. N.; JOHNSON, R. B. (ed.). **The Oxford handbook of multimethod and mixed methods research inquiry**. Oxford - UK: Oxford University Press, 2015.

HOWARTH, R. W. An assessment of human influences on fluxes of nitrogen from the terrestrial landscape to the estuaries and continental shelves of the North Atlantic Ocean. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, New York - NY, v. 52, p. 213-223, 1998.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied energy**, Stockholm - Sweden, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

KHAN, S. A.; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U. C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Dublin - Ireland v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KIM, Se-Kwon (Ed.). **Handbook of marine microalgae: Biotechnology advances**. Academic Press, 2015.

KISHORE, R. A.; TIWARI, R.; DVIVEDI, A.; SINGH, I. Taguchi analysis of the residual tensile strength after drilling in glass fiber reinforced epoxy composites. **Materials & Design**, Roorkee - India, v. 30, n. 6, p. 2186-2190, 2009.

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C. G.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, Georgia - USA, v. 31, n. 1-2, p. 122-132, 2002.

LEE, B. K.; KYUN K., J. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. Rehovot - Israel, **Aquacultural Engineering**, v. 25, n. 2, p. 111-124, 1 set. 2001.

LI, Z. S.; YUAN, H.; YANG, J.; LI, B. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 102, n. 19, p. 9128-9134, 2011.

LOURENÇO, F. R.; TRAPLE, M. A. L.; OKAMOTO, R. T.; PINTO, T. J. A. Development and validation of microbiological assay for ceftriaxone and its application in photo-stability study. **Current Pharmaceutical Analysis**, Sharjah - United Arab Emirate, v. 9, n. 1, p. 77-81, 2013.

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

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

Paulista, Guaratinguetá - SP, 2016.

LÜ, J.; SHEAHAN, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. Dalian - China, **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 7, p. 2451-2466, 2011.

LV, J.; GUO, J.; FENG, J.; LIU, Q.; XIE, S. Effect of sulfate ions on growth and pollutants removal of self-flocculating microalga *Chlorococcum* sp. GD in synthetic municipal wastewater. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 234, p. 289-296, 2017.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K. **Microbiologia de Brock**. 14.ed. Porto Alegre - RS: Artmed Editora, 2016. p. 151-155.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Brasília: Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2013.

MANFIO, M. L.; AGARRAYUA, D. A.; MACHADO, J. C.; SCHMIDT, C. A. A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo - SP, v. 49, n. 4, p. 753-762, 2013.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. **Journal of Fermentation Bioengineering**, Higashi-Hiroshima - Japan, v. 5, p. 408-410, 1993.

MARQUES, S. S. I. **Microalgas como matéria-prima para geração de biocombustíveis: uso da vinhaça como alternativa de redução de custos e contribuição à sustentabilidade**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, Dublin - Ireland, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MILIĆ, N.; MILANOVIĆ, M.; LETIĆ, N. G.; SEKULIĆ, M. T.; RADONIĆ, J.; MIHAJLOVIĆ, I.; MILORADOV, M. V. Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment. **International journal of environmental health research**, Abingdon - England, v. 23, n. 4, p. 296-310, 2013.

MINITAB 19. **Software estatístico**. Disponível em: <https://www.minitab.com>. Acesso em: 20 jul. 2019.

MIRANDA, J. R. P. C. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. Tese (Doutorado em Energia e Bioenergia) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa - Portugal, 2011.

MÓDENES, A. N.; PIETROBELLI, J. M. T. D. A.; QUIÑONES, F. R. E.; SUZAKI, P. Y. R.; ALFLEN, V. L.; KLEN, M. R. D. S. F. Potencial de biossorção do zinco pela macrófita *Egeria densa*. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro - RJ, v. 14, p. 465-470, 2009.

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

MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 102, n. 1, p. 57-70, 2011.

NASCIMENTO, R. C. **Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi - TO, 2016.

NEJAT, P.; JOMEHZADEH, F.; TAHERI, M. M.; GOHARI, M.; MAJID, M. Z. A. A global review of energy consumption, CO<sub>2</sub> emissions and policy in the residential sector (with an overview of the top ten CO<sub>2</sub> emitting countries). **Renewable and sustainable energy reviews**, Dublin - Ireland, v. 43, p. 843-862, 2015.

NELLIAN, S. **Integration of Taguchi design of experiments and finite element method for robust design**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Massachusetts University: USA, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p.769-795.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010.

NETRAVALI, A. N.; CHABBA, S. Composites get greener. **Materials Today**, Ithaca - NY, v. 6, n. 4, p. 22-29, 2003.

OLGUÍN, E. J.; SÁNCHEZ-GALVÁN, G.; GONZÁLEZ-PORTELA, R. E.; LÓPEZ-VELA, M. Constructed wetland mesocosms for the treatment of diluted sugarcane molasses stillage from ethanol production using *Pontederia sagittata*. **Water research**, Oxford - England, v. 42, n. 14, p. 3659-3666, 2008.

OLIVER, J. W. K.; ATSUMI, S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. **Photosynthesis research**, Baton Rouge - USA, v. 120, n. 3, p. 249-261, 2014.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; BALINT, O.; STADEN, J. V.; LOVÁSZ, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. **Journal of Applied Phycology**, Mosonmagyaróvár - Hungary, v. 24, n. 4, p. 907–914, 2012.

ORES, J. C.; FERNANDES, S. S.; DE AMARANTE, M. C. A.; DA SILVA, B. P.; KALIL, S. J. Tecnologia enzimática para captura de CO<sub>2</sub>: cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica. **VETOR: Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, Rio Grande - RS, v. 23, n. 2, p. 82-92, 2013.

ÓRPEZ, R.; MARTÍNEZ, M. E.; HODAIFA, G.; EL YOUSFI, F., JBARI, N.; SÁNCHEZ, S. Growth of the microalgae *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Desalination**, Swansea - UK, v. 246, n. 1-3, p. 625-630, 2009.

PALUDO, M. P. **Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande do Sul.

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

PHADKE, M. S. **Quality engineering using robust design**. New Jersey - USA: PTR Prentice-Hall. Inc., Englewood Cliffs, NJ, 1989.

PRATA, J. C. **Avaliação da toxicidade do antibiótico doxiciclina isoladamente e na presença de microplásticos na microalga marinha *Tetraselmis chuii***. 2016. Relatório final de estágio (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2016.

PULSHEN, A.; GOMES, M. P. M.; BASTOS, R.; SOUZA, C. Tratamento biológico de efluentes sanitários em ETE mista. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS, 3., 2013, São Pedro - SP. **Anais [...]**, Brasília, DF: Embrapa, 2013.

QUINTELAS, C.; FERNANDES, B.; CASTRO, J.; FIGUEIREDO, H.; TAVARES, T. Biosorption of Cr (VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon - a comparative study. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam - NL, v. 153, n. 1-2, p. 799-809, 2008.

RA, C. H.; KANG, C. H.; JUNG, J. H.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource technology**, Trivandrum - India, v. 212, p. 254-261, 2016.

RANA, R. S.; PUROHIT, R.; SHARMA, A. K.; RANA, S. Optimization of wear performance composites using taguchi method. **Procedia Materials Science**, Basel - Switzerland, v. 6, p. 503 - 511, 2014.

RANJIT, R. K. **A primer on the taguchi method**. 2. ed. New York: Society of Manufacturing Engineers, 2010.

REN, X.; CHEN, J.; DESCHÊNES, J. S.; TREMBLAY, R.; JOLICOEUR, M. Glucose feeding recalibrates carbon flux distribution and favours lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* through cell energetic management. **Algal research**, Los Alamos - USA v. 14, p. 83-91, 2016.

RÍOS PINTO, L. F. **Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a produção de biodiesel**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química) –Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas - SP, 2014.

ROMERO-LOPEZ, J.; LOPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. **Aquatic toxicology**, Amsterdam - Netherlands, v. 124, p. 227-237, 2012.

SAMIMI, A.; ZARINABADI, S. Reduction of greenhouse gases emission and effect on environment. **Journal of American Science**, Stamford - USA, v. 8, n. 8, p. 1011-1015, 2012.

SANI, Y. M.; DAUD, W. M. A. W.; AZIZ, A. R. A. Solid acid: catalyzed biodiesel production from microalgal oil - the dual advantage. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Nicosia - Cyprus, v. 1, n. 3, p. 113-121, 2013.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam - NL, v. 175, n. 1-3, p. 45-95, 2010.

SANTOS, I. D. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, Porto Alegre - RS, v. 15, n. 3, p. 189-197, 2005.

SANTOS, V. S. **Aprenda o que é clorofila e conheça seus tipos e a importância desse pigmento para plantas, algas e cianobactérias**. Disponível em: <https://escolakids.uol.com.br/ciencias/clorofila.htm>. Acesso em: 15 jan. 2019.

SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H. G. C.; SANTOS, T. F. C.; SCHUELER, L.; GUERRA, R.; BARREIRA, L. A.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. **Algal Research**, Los Alamos - USA, v. 16, p. 387-398, 2016.

SciELO. **Base de dados bibliográficos**. Disponível em: <https://www.scielo.org/>. Acesso em: 08 fev. 2020.

SCIENCE DIRECT. **Base de dados bibliográficos**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 08 fev. 2020.

SCOPUS. **Base de dados bibliográficos**. Disponível em: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic.com>. Acesso em: 08 fev. 2020.

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

SILVA, J. M.; KONRADT-MORAES, L. C. Vantagens e desvantagens dos biocombustíveis e dos combustíveis fósseis. **Anais do SEMEX**, v. 5, n. 5, 2012.

SILVA, H. R. **Microalgas de águas continentais**. Londrina – PR: Editora IAPAR, 2014.

SILVA, R. A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. D.; COSTA, J. D. Composição e propriedades terapêuticas do Mel de Abelha. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara - SP, v. 17, n. 1, p. 113-20, jan./mar. 2006.

SIMÕES, P. R.; VILLAR, J. E.; LUCHE, D. E. D.; SILVA, M. B.; GONÇALVES, B. C. M. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo da microalga *Chlorella minutissima* como alternativa para o tratamento de dermatite atópica. **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais - PR, v. 5, n. 11, p. 24893-24914, 2019.

SOLIMENO, A.; SAMSÓ, R.; UGGETTI, E.; SIALVE, B.; STEYER, J. P.; GABARRÓ, A.; GARCÍA, J. New mechanistic model to simulate microalgae growth. **Algal Research**, Los Alamos - USA, v. 12, p. 350-358, 2015.

SOUZA, B. A.; ROUBIK, D.; W.; BARTH, O. M.; HEARD, T. A.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C.; VILLAS-BÔAS, J.; MARCHINI, L.; LOCATELLI, J.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L.; BOGDANOV, S.; VIT, P. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciência**, Rio de Janeiro - RJ, v. 31, n. 12, 2006.

SOUZA, C. F.; BASTOS, R. G.; GOMES, M. P. D. M.; PULSCHEN, A. A. Eficiência de estação de tratamento de esgoto doméstico visando reuso agrícola. **Ambiente & Água: an interdisciplinary journal of applied science**, Taubaté - SP, v. 10, n. 3, p. 587-597, 2015.

SOUZA, H. J. C.; MOYSES, C. B.; PONTES, F. J.; DUARTE, R. N.; SILVA, E. S. S.; ALBERTO, F. L.; FERREIRA, U. R.; SILVA, M. B. Molecular assay optimized by Taguchi experimental design method for venous thromboembolism investigation. **Molecular and Cellular Probes**, London - England, v. 25, n. 5-6, p. 231-237, 2011.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. D.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria - RS, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Dublin - Ireland, v. 55, p. 909-941, 2016.

TAGUCHI, Genichi. **Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes**. 7.ed. White Plains, N.Y.: Asian Productivity Organization, 1986. 191 p.

TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHANG, J. S.; LING, T. C.; LAN, J. C. W. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: a recent review. **Biotechnology advances**, Rehovot - Israel, v. 33, n. 6, p. 1219-1227, 2015.

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

TEIXEIRA, J. R.; GRANER, E. F. Effects of environmentally-relevant antibiotic mixtures on marine microalgal growth. **Science of the Total Environment**, Amsterdam - Netherlands, v. 580, p. 43-49, 2017.

TOLMASQUIM, M. T. **Fontes renováveis de energia no Brasil**. Rio de Janeiro - RJ: CENERGIA, COPPE-Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação em Engenharia, UFRJ-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, Trivandrum - India, v. 38, p. 95-100, 1991.

TUANTET, K.; JANSSEN, M.; TEMMINK, H.; ZEEMAN, G.; WIJFFELS, R. H.; BUISMAN, C. J. Microalgae growth on concentrated human urine. **Journal of applied phycology**, Mosonmagyaróvár - Hungary, v. 26, n. 1, p. 287-297, 2014.

TUNDISI, J. G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos avançados**, São Paulo - SP, v. 22, n. 63, p. 7-16, 2008.

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

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara - SP, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

VOSviewer. **Software de análise bibliométrica**. Disponível em: <https://www.vosviewer.com>. Acesso em: 20 jul. 2019.

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

WEB OF SCIENCE. **Base de dados bibliográficos**. Disponível em: [http://apps.webofknowledge.com/WOS\\_GeneralSearch\\_input.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&SID=8D2CygYxYwsDkGwVrgr&preferencesSaved](http://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=8D2CygYxYwsDkGwVrgr&preferencesSaved). Acesso em: 08 fev. 2020.

WITTER, G. P. **Leitura: textos e pesquisas**. Campinas: Alínea, 1999.

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

ZAMORA FALLAS, L. G. **Characterization of bioactive constituents from honey produced by costa rican stingless bees**. Thesis (PhD thesis with summary in Dutch Chemical Biology & Drug Discovery) - Utrecht University, Utrecht - Netherlands, 2018.

ZHU, X. G.; LONG, STEPHEN P.; ORT, D. R. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? **Current opinion in biotechnology**, London - England, v. 19, n. 2, p. 153-159, 2008.

ZORN, S. M. F. E.; PEDRO, G. A.; AMARAL, M. S.; LOURES, C. C. A.; SILVA, M. B. Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídeos da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* via solventes. **Holos**, Natal - RN, v. 2, p. 66-79, 2017.

## APÊNDICE A - PARÂMETROS CINÉTICOS DE CADA UM DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS

Neste apêndice são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos, tais como: concentração de células ( $\text{g.L}^{-1}$ ), produtividade P ( $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), taxa de crescimento r ( $\text{dia}^{-1}$ ) e tempo de duplicação k ( $\text{dia}^{-1}$ ) referentes a cada dia do período de cultivo, a fim de determinar o crescimento celular. Os valores de cada parâmetro para cada dia de cultivo podem ser observados nas Tabelas 20 a 28.

Tabela 20 - Parâmetros cinéticos do Experimento 1.

Tempo (dias)	Concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ )	P ( $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ )	r ( $\text{dia}^{-1}$ )	k ( $\text{dia}^{-1}$ )
0	0,21 ± 0,84	-	-	-
1	0,24 ± 0,84	32,17 ± 1,68	0,15 ± 0,09	0,22 ± 0,09
2	0,28 ± 1,69	38,12 ± 1,26	0,12 ± 0,07	0,17 ± 0,07
3	0,28 ± 0,42	25,31 ± 0,14	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,00
4	0,29 ± 1,69	21,14 ± 0,63	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,00
5	0,27 ± 0,42	13,04 ± 0,08	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,00
6	0,25 ± 1,69	6,45 ± 0,42	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01
7	0,27 ± 2,11	8,29 ± 0,42	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00
8	0,27 ± 0,84	7,29 ± 0,21	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00
9	0,29 ± 0,42	9,03 ± 0,14	0,31 ± 0,01	0,04 ± 0,01
10	0,26 ± 0,42	5,33 ± 0,12	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00
11	0,33 ± 1,69	11,26 ± 0,23	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,00
12	0,33 ± 2,11	10,45 ± 0,10	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,00
13	0,35 ± 1,26	11,06 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,00
14	0,38 ± 0,42	12,27 ± 0,09	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 21 - Parâmetros cinéticos do Experimento 2.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,22 ± 0,42	-	-	-
1	0,37 ± 0,42	146,55 ± 0,00	0,53 ± 0,03	0,77 ± 0,04
2	0,50 ± 0,42	134,34 ± 0,42	0,41 ± 0,02	0,59 ± 0,02
3	0,73 ± 0,00	168,04 ± 0,14	0,41 ± 0,01	0,58 ± 0,01
4	0,80 ± 0,84	144,65 ± 0,10	0,33 ± 0,01	0,47 ± 0,01
5	0,80 ± 1,69	115,36 ± 0,25	0,26 ± 0,00	0,37 ± 0,00
6	0,91 ± 1,69	114,40 ± 0,35	0,24 ± 0,00	0,34 ± 0,00
7	0,95 ± 0,84	104,44 ± 0,06	0,22 ± 0,00	0,31 ± 0,00
8	1,29 ± 1,26	134,15 ± 0,10	0,21 ± 0,01	0,31 ± 0,01
9	1,43 ± 0,00	133,84 ± 0,05	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,01
10	1,60 ± 0,00	136,18 ± 0,04	0,2 ± 0,00	0,29 ± 0,02
11	1,34 ± 2,53	101,54 ± 0,26	0,16 ± 0,00	0,24 ± 0,00
12	1,14 ± 2,53	76,25 ± 0,24	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,00
13	1,02 ± 2,53	61,72 ± 0,16	0,12 ± 0,00	0,17 ± 0,00
14	1,29 ± 1,26	76,52 ± 0,12	0,12 ± 0,00	0,18 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 22 - Parâmetros cinéticos do Experimento 3.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,21 ± 0,00	-	-	-
1	0,50 ± 0,42	271,36 ± 0,42	0,79 ± 0,00	1,13 ± 0,00
2	0,73 ± 0,84	259,95 ± 0,42	0,60 ± 0,00	0,86 ± 0,00
3	0,86 ± 1,69	214,41 ± 0,56	0,46 ± 0,01	0,66 ± 0,01
4	0,77 ± 2,53	139,21 ± 0,63	0,31 ± 0,01	0,45 ± 0,01
5	0,74 ± 3,37	104,81 ± 0,67	0,23 ± 0,00	0,34 ± 0,01
6	0,91 ± 1,18	116,40 ± 0,20	0,23 ± 0,00	0,34 ± 0,01
7	0,91 ± 0,84	98,95 ± 0,12	0,20 ± 0,00	0,30 ± 0,00
8	1,11 ± 1,69	112,13 ± 0,21	0,20 ± 0,00	0,30 ± 0,00
9	1,27 ± 2,53	117,72 ± 0,28	0,19 ± 0,00	0,28 ± 0,00
10	1,36 ± 1,26	114,26 ± 0,12	0,18 ± 0,00	0,26 ± 0,00
11	1,39 ± 1,26	106,95 ± 0,11	0,16 ± 0,00	0,24 ± 0,00
12	1,45 ± 2,53	102,73 ± 0,21	0,15 ± 0,00	0,23 ± 0,00
13	1,48 ± 2,53	97,58 ± 0,19	0,14 ± 0,00	0,21 ± 0,00
14	1,46 ± 3,79	88,89 ± 0,27	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 23 - Parâmetros cinéticos do Experimento 4.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,23 ± 0,00	-	-	-
1	0,56 ± 0,42	334,00 ± 0,42	0,84 ± 0,17	1,21 ± 0,17
2	0,91 ± 1,69	340,08 ± 0,84	0,68 ± 0,04	0,98 ± 0,01
3	1,08 ± 0,84	283,71 ± 0,28	0,52 ± 0,00	0,75 ± 0,00
4	1,12 ± 0,84	222,91 ± 0,21	0,37 ± 0,03	0,54 ± 0,03
5	1,13 ± 1,69	180,60 ± 0,33	0,30 ± 0,04	0,43 ± 0,04
6	1,27 ± 0,00	174,39 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,41 ± 0,00
7	1,27 ± 1,26	149,09 ± 0,18	0,24 ± 0,01	0,35 ± 0,01
8	1,54 ± 1,26	163,97 ± 0,15	0,23 ± 0,01	0,34 ± 0,01
9	1,54 ± 1,26	145,55 ± 0,14	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,01
10	1,54 ± 1,26	131,00 ± 0,12	0,19 ± 0,00	0,28 ± 0,01
11	1,50 ± 1,26	115,35 ± 0,11	0,17 ± 0,00	0,25 ± 0,00
12	1,45 ± 2,53	102,24 ± 0,21	0,15 ± 0,00	0,22 ± 0,00
13	1,45 ± 2,53	93,82 ± 0,19	0,14 ± 0,00	0,21 ± 0,00
14	1,39 ± 3,79	82,97 ± 0,27	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 24 - Parâmetros cinéticos do Experimento 5.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,22 ± 0,00	-	-	-
1	0,22 ± 1,26	0,00 ± 1,26	0,00 ± 0,15	0,00 ± 0,15
2	0,29 ± 1,69	32,47 ± 0,84	0,20 ± 0,11	0,30 ± 0,11
3	0,34 ± 0,42	40,01 ± 0,14	0,22 ± 0,11	0,32 ± 0,11
4	0,42 ± 0,84	50,79 ± 0,21	0,19 ± 0,04	0,28 ± 0,04
5	0,50 ± 0,42	50,06 ± 0,08	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,01
6	0,50 ± 2,11	46,32 ± 0,35	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,03
7	0,47 ± 1,26	35,87 ± 0,18	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,02
8	0,45 ± 0,42	28,85 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,02
9	0,45 ± 2,11	25,38 ± 0,23	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,02
10	0,44 ± 1,69	21,86 ± 0,17	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,01
11	0,45 ± 1,26	20,60 ± 0,11	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,00
12	0,45 ± 0,84	19,26 ± 0,07	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,00
13	0,46 ± 1,69	18,01 ± 0,13	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00
14	0,49 ± 1,26	18,91 ± 0,09	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 25 - Parâmetros cinéticos do Experimento 6.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,23 ± 1,26	-	-	-
1	0,34 ± 0,42	106,64 ± 0,84	0,43 ± 0,01	0,63 ± 0,01
2	0,56 ± 1,69	161,60 ± 0,21	0,49 ± 0,04	0,70 ± 0,04
3	0,77 ± 0,84	178,76 ± 0,70	0,43 ± 0,02	0,62 ± 0,02
4	0,93 ± 0,00	174,43 ± 0,31	0,35 ± 0,01	0,51 ± 0,01
5	0,99 ± 3,37	151,46 ± 0,92	0,30 ± 0,00	0,43 ± 0,00
6	0,98 ± 3,37	123,83 ± 0,77	0,22 ± 0,01	0,32 ± 0,01
7	1,04 ± 1,69	114,65 ± 0,42	0,20 ± 0,01	0,29 ± 0,01
8	1,63 ± 2,53	174,17 ± 0,15	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,01
9	1,71 ± 3,79	164,25 ± 0,56	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,01
10	1,44 ± 2,53	121,11 ± 0,37	0,18 ± 0,00	0,26 ± 0,01
11	1,39 ± 2,53	105,55 ± 0,11	0,16 ± 0,00	0,23 ± 0,00
12	1,25 ± 2,53	84,69 ± 0,31	0,14 ± 0,00	0,20 ± 0,00
13	1,13 ± 3,79	69,30 ± 0,38	0,12 ± 0,00	0,18 ± 0,00
14	1,19 ± 3,79	68,06 ± 0,18	0,12 ± 0,00	0,17 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 26 - Parâmetros cinéticos do Experimento 7.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,22 ± 0,84	-	-	-
1	0,33 ± 0,00	107,83 ± 0,84	0,55 ± 0,22	0,80 ± 0,22
2	0,71 ± 2,53	244,16 ± 1,68	0,52 ± 0,07	0,75 ± 0,07
3	0,89 ± 1,69	222,55 ± 0,84	0,45 ± 0,01	0,65 ± 0,01
4	0,82 ± 2,53	148,30 ± 0,84	0,35 ± 0,04	0,51 ± 0,04
5	0,80 ± 3,37	115,42 ± 0,50	0,30 ± 0,05	0,42 ± 0,05
6	0,91 ± 0,84	113,96 ± 0,28	0,24 ± 0,01	0,35 ± 0,01
7	0,99 ± 1,69	109,68 ± 0,36	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,01
8	1,57 ± 2,53	168,63 ± 0,21	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,01
9	1,58 ± 3,79	151,18 ± 0,51	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,01
10	1,47 ± 1,26	125,16 ± 0,21	0,19 ± 0,00	0,27 ± 0,01
11	1,52 ± 2,53	117,60 ± 0,15	0,17 ± 0,00	0,25 ± 0,00
12	1,57 ± 5,06	112,56 ± 0,49	0,16 ± 0,00	0,23 ± 0,00
13	1,58 ± 2,53	104,04 ± 0,13	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,00
14	1,55 ± 2,53	94,57 ± 0,12	0,14 ± 0,00	0,20 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 27 - Parâmetros cinéticos do Experimento 8.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	0,22 ± 0,42	-	-	-
1	0,38 ± 2,11	158,47 ± 2,52	0,54 ± 0,01	0,775 ± 0,01
2	0,75 ± 3,37	263,68 ± 1,89	0,61 ± 0,01	0,881 ± 0,01
3	1,01 ± 0,84	263,36 ± 0,42	0,50 ± 0,00	0,73 ± 0,00
4	1,09 ± 2,53	217,77 ± 0,73	0,40 ± 0,00	0,57 ± 0,00
5	1,06 ± 3,37	167,66 ± 0,75	0,32 ± 0,02	0,47 ± 0,02
6	1,08 ± 0,84	143,20 ± 0,07	0,26 ± 0,01	0,37 ± 0,01
7	1,02 ± 0,84	113,90 ± 0,06	0,22 ± 0,00	0,31 ± 0,00
8	1,05 ± 3,37	103,30 ± 0,47	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,01
9	1,13 ± 1,69	100,96 ± 0,23	0,18 ± 0,01	0,27 ± 0,01
10	1,19 ± 3,79	96,77 ± 0,33	0,17 ± 0,00	0,24 ± 0,00
11	1,17 ± 1,26	85,70 ± 0,07	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,00
12	1,09 ± 2,53	72,08 ± 0,17	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,00
13	1,05 ± 2,53	63,37 ± 0,22	0,12 ± 0,00	0,17 ± 0,00
14	1,20 ± 2,53	69,44 ± 0,21	0,12 ± 0,00	0,17 ± 0,00

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

Fonte: Autora.

Tabela 28 - Parâmetros cinéticos do Experimento Controle.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de células (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>r (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>k (dia<sup>-1</sup>)</b>
0	8,76	-	-	-
1	12,93	4,17	0,39	0,56
2	15,31	3,28	0,28	0,40
3	20,08	3,77	0,28	0,40
4	43,91	8,79	0,40	0,58
5	61,78	10,60	0,39	0,56
6	70,72	10,33	0,35	0,50
7	110,04	14,47	0,36	0,52
8	157,10	18,54	0,36	0,52
9	198,21	21,05	0,35	0,50
10	230,38	22,16	0,33	0,47
11	240,50	21,07	0,30	0,43
12	321,53	26,06	0,30	0,43
13	390,04	29,33	0,29	0,42
14	435,32	30,47	0,28	0,40

**P:** produtividade; **r:** taxa de crescimento; **k:** taxa de geração.

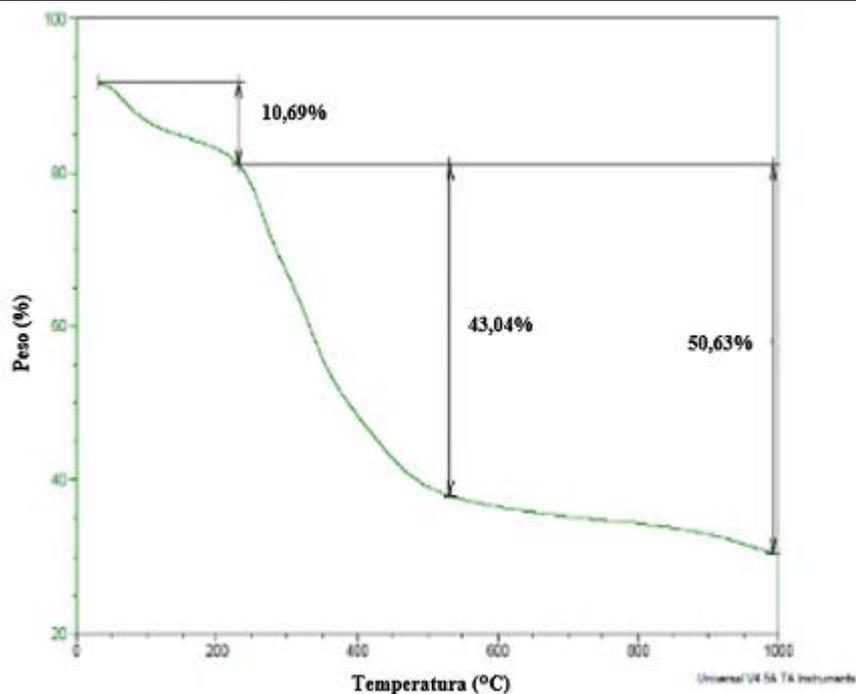
Fonte: Autora.

## APÊNDICE B - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA BIOMASSA PRODUZIDA PELOS EXPERIMENTOS

Este Apêndice compara as etapas e eventos ocorridos nos experimentos realizados, levando em consideração a perda de biomassa em casa faixa de temperatura (T) e a porcentagem de biomassa queimada (BQ). A Tabela 29 apresenta a análise do Experimento 1 e a Tabela 30 a análise do Experimento 2.

Tabela 29 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 1.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-250 °C	10,69 %	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
2°	250-540 °C	43,04%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
3°	540-1000°C	7,59%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	61,32%	-
<b>Cinzas</b>	-	38,68%	-

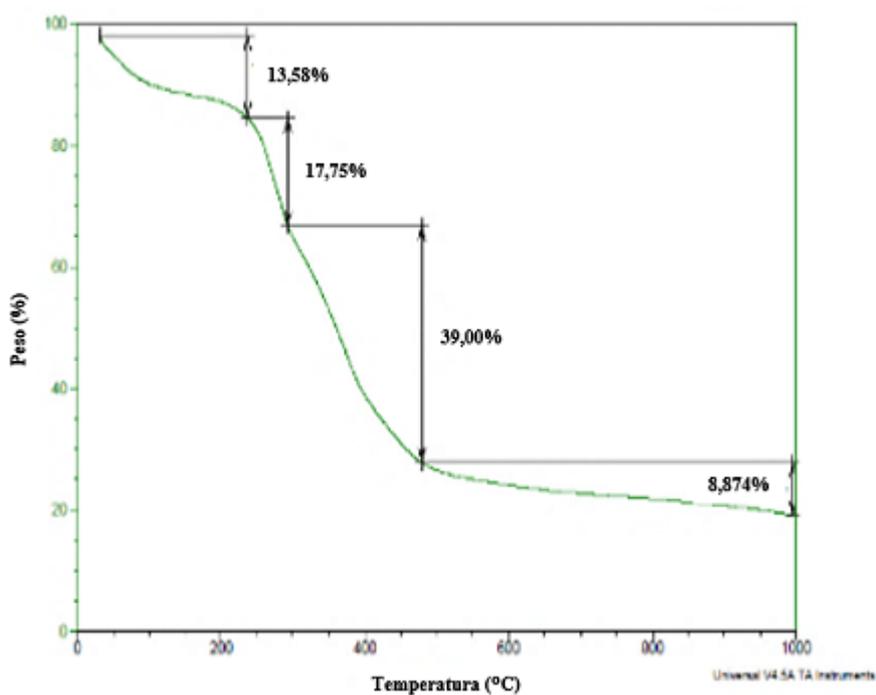


**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

Fonte: Autora.

Tabela 30 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 2.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-250°C	13,58%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
2°	250-300°C	17,73%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
3°	300-470°C	39,00%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
4°	470-1000°C	8,67%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	78,98%	-
<b>Cinzas</b>	-	21,02%	-



**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

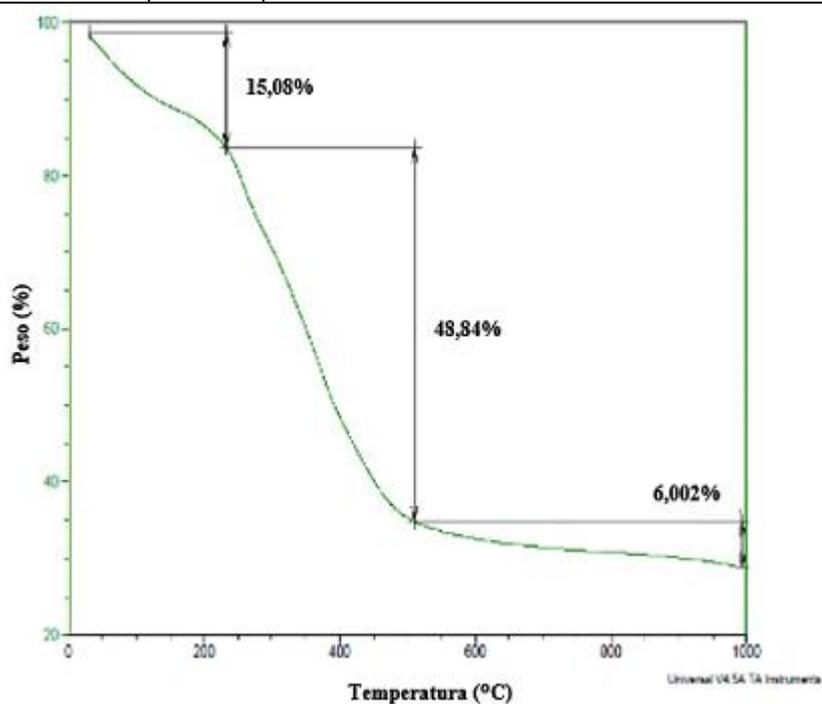
Fonte: Autora.

Ao comparar os Experimentos 1 e 2, nota-se que ambos obtiveram o primeiro evento perda de biomassa entre 50-250°C, perdendo cerca de 10,69% e 13,58%, respectivamente. Portanto, pode-se dizer que as condições do Experimento 2 favoreceram a maior degradação da biomassa quando comparado ao Experimento 1. Este fato pode estar relacionado com a adição de fontes de carbono orgânico (mel, glicose e sacarose) ao cultivo do Experimento 2,

fazendo com que a combustão da biomassa seja mais rápida. A Tabela 31 apresenta a análise do Experimento 3.

Tabela 31 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 3.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-240°C	15,08%	Quebra de proteínas e fosfolípidos + decomposição de carboidratos e proteínas
2°	240-510°C	48,84%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
3°	510-1000°C	6,00%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	69,92%	-
<b>Cinzas</b>	-	30,08	-



**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

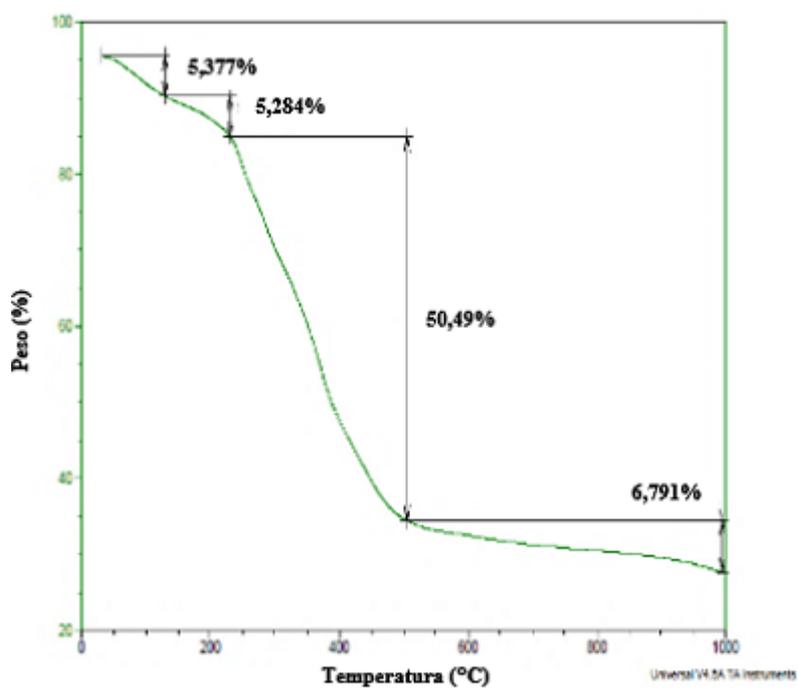
Fonte: Autora.

Comparando as análises dos três experimentos, todos apresentaram etapas iguais nos eventos 1 e 3, diferindo apenas no Experimento 2, o qual obteve quatro eventos de perda de biomassa.

Assim como feito anteriormente, na Tabela 32 observa-se a análise do Experimento 4 e na Tabela 33 observa-se a análise do Experimento 5.

Tabela 32 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 4.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-145°C	5,37%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos
2°	145-240°C	5,28%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
3°	240-505°C	50,49%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
4°	505-1000°C	6,79%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	67,93%	-
<b>Cinzas</b>	-	32,07%	-

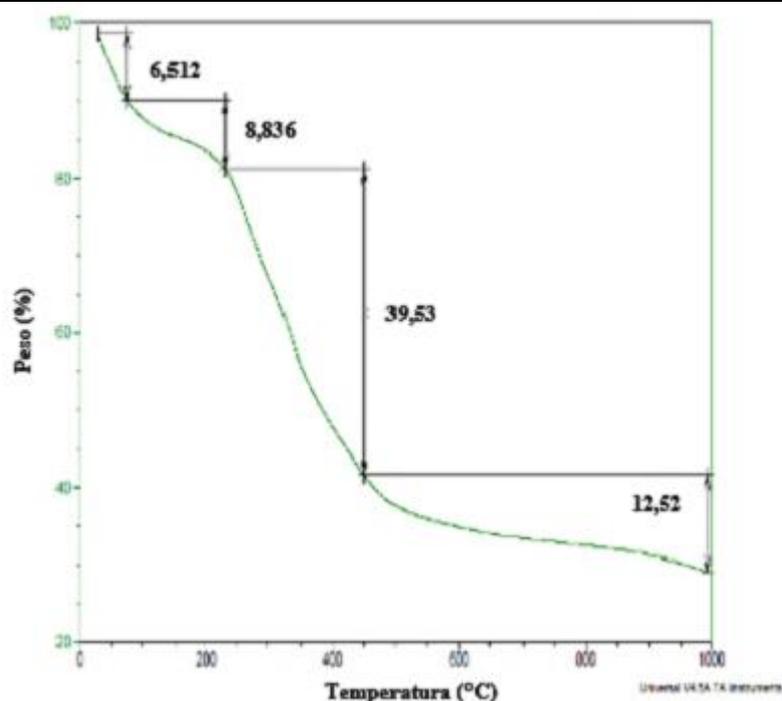


**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

Fonte: Autora.

Tabela 33 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 5.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-80°C	6,51%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos
2°	80-250°C	8,83%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
3°	250-460°C	39,53%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
4°	460-1000°C	12,52%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	69,39%	-
<b>Cinzas</b>	-	30,61%	-



**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

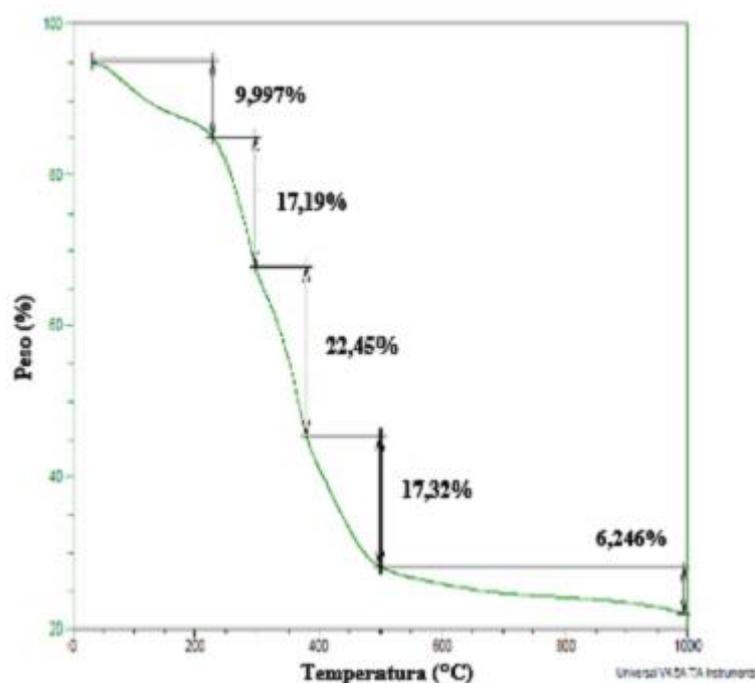
Fonte: Autora.

Comparando os eventos obtidos pelos Experimentos 4 e 5, pode-se dizer que estes obtiveram etapas iguais entre si, porém em faixas de temperatura diferentes para cada evento. Nota-se também que, enquanto o Experimento 4 perdeu apenas 5,37% da biomassa entre a faixa de temperatura de 0-145°C, o Experimento 5 obteve maior perda de biomassa (6,51%) entre 0-80°C. Portanto, as condições do Experimento 5 favoreceram para a maior combustão da biomassa em menor temperatura.

Na Tabela 34 é possível observar os dados da análise do Experimento 6.

Tabela 34 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 6.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-230°C	9,99%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
2°	230-300°C	17,19%	Decomposição de carboidratos e proteínas
3°	300-375°C	22,45%	Decomposição de carboidratos e proteínas
4°	375-500°C	17,32%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
5°	500-1000°C	6,24%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	72,28%	-
<b>Cinzas</b>	-	27,72%	-



**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

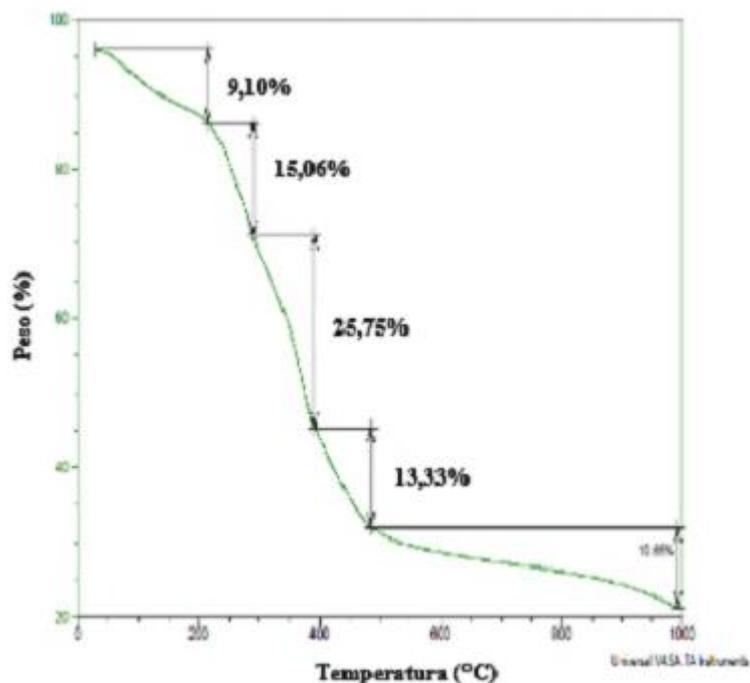
Fonte: Autora.

Pode-se dizer que o Experimento 6 apresentou maior número de eventos ocorridos quando comparado aos Experimentos 4 e 5, podendo-se dizer que a biomassa deste experimento necessitou de temperaturas maiores para maior degradação.

A análise do Experimento 7 são notáveis na Tabela 35, enquanto os dados da análise do Experimento 8 estão plotados na Tabela 36.

Tabela 35 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 7.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-230°C	9,83%	Quebra de proteínas e fosfolípídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
2°	230-300°C	15,06%	Decomposição de carboidratos e proteínas
3°	300-395°C	25,75%	Decomposição de carboidratos e proteínas
4°	395-485°C	13,33%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
5°	485-1000°C	10,65%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	74,62%	-
<b>Cinzas</b>	-	25,38%	-

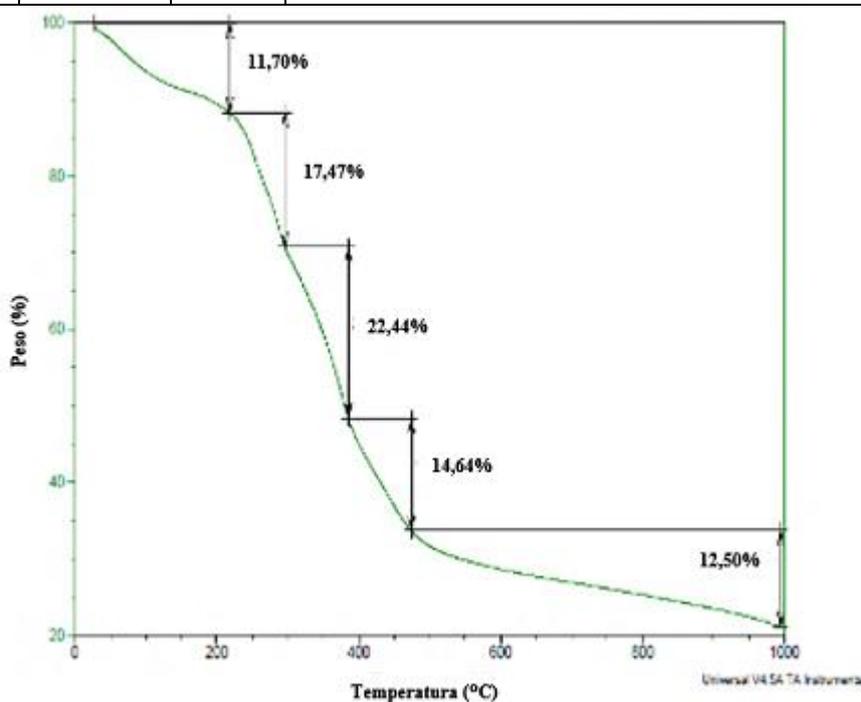


**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

Fonte: Autora.

Tabela 36 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento 8.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-230°C	11,70%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
2°	230-300°C	17,47%	Decomposição de carboidratos e proteínas
3°	300-390°C	22,44%	Decomposição de carboidratos e proteínas
4°	390-470°C	14,64%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
5°	470-1000°C	12,50%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	81,75%	-
<b>Cinzas</b>	-	18,25%	-



**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

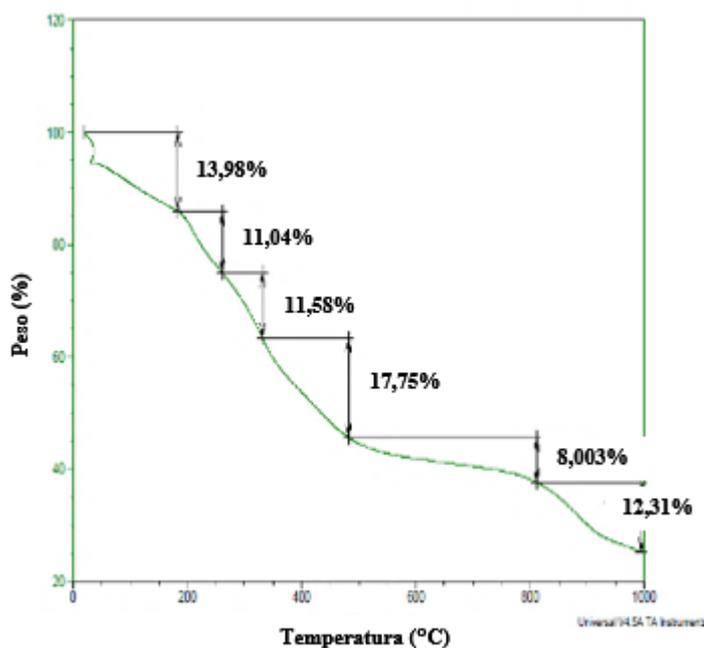
Fonte: Autora.

Nota-se que os Experimentos 7 e 8 obtiveram dois eventos de perda de biomassa em temperaturas iguais, os quais ocorreram entre 40-230°C (perdendo cerca de 9,83% e 11,70% da biomassa, respectivamente), e entre 230-300°C (com perda de 15,06% e 17,47% da biomassa dos respectivos experimentos). Portanto, pode-se dizer que as condições do Experimento 8 são mais favoráveis para a queima mais rápida da biomassa da microalga *C. minutissima* quando comparadas às condições do Experimento 7.

A análise termogravimétrica também foi realizada para o Experimento Controle, a qual pode ser observada na Tabela 37.

Tabela 37 - Análise termogravimétrica em atmosfera inerte (nitrogênio) para a biomassa do Experimento Controle.

Evento	Faixa de T	BQ	Ocorrência
1°	0-190°C	13,98%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos
2°	190-270°C	11,04%	Quebra de proteínas e fosfolipídeos + decomposição de carboidratos e proteínas
3°	270-340°C	11,58%	Decomposição de carboidratos e proteínas
4°	340-480°C	17,75%	Decomposição de carboidratos e proteínas + quebra da cadeia de ácidos graxos
5°	480-815°C	8,00%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
6°	815-1000°C	12,31%	Quebra da cadeia de ácidos graxos
<b>Total BQ</b>	-	74,66%	-
<b>Cinzas</b>	-	25,34%	-



**Faixa de T:** Faixa de Temperatura; **Total BQ:** Total de Biomassa Queimada.

Fonte: Autora.

Quando comparados ao Experimento Controle (o qual obteve o maior número de eventos comparado a todos os experimentos analisados), nota-se que os experimentos 7 e 8 obtiveram também todas as etapas de combustão idênticas.