

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

VICTOR FERNANDES MARINO

**Análises dos parâmetros de cultivo da microalga *Chlorella  
vulgaris***

Lorena  
2018



VICTOR FERNANDES MARINO

Análises dos parâmetros de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Produtos e Processos

**Orientador:** Prof. Dra Daniela Helena Pelegrine Guimarães

Versão Corrigida

Lorena  
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fernandes Marino, Victor

Análises dos parâmetros de cultivo da microalga  
*Chlorella vulgaris* / Victor Fernandes Marino;  
orientador Daniela Helena Pelegrine Guimarães -  
Versão Corrigida. - Lorena, 2018.  
65 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Química na Área de  
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de  
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.  
2018

1. *Chlorella vulgaris*. 2. Nutrientes. 3.  
Luminosidade. 4. Reutilização da biomassa.. I. Título.  
II. Helena Pelegrine Guimarães, Daniela, orient.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, José e Rita, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas.

Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Muitíssimo obrigado.



## RESUMO

MARINO, V. F. **Análises dos parâmetros de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris***. 2018. 65 p. Dissertação(Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

A produção de biocombustíveis a partir das microalgas vem se tornando promissora por ser uma fonte renovável, não poluente e por não competir com áreas de cultivo de alimentos. Devido à exaustão das fontes fósseis e à alta demanda por combustível de origem renovável e não poluente, as microalgas vêm despertando interesse nos cenários energético e ambiental. Por outro lado, existe um elevado custo no cultivo das mesmas, fazendo-se necessário estudos para desenvolvimento de novos reatores, meios de cultivos, técnicas de colheita, de extração de lipídios, transesterificação e também a implementação do conceito de biorrefinaria. Levando em conta o interesse crescente na utilização das microalgas como matéria prima na produção de biocombustíveis e a necessidade de estudos que torne o cultivo das microalgas em grande escala economicamente viável, esta pesquisa teve como objetivo determinar as melhores condições para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, buscando uma maior produtividade de biomassa e de lipídios. Os fatores avaliados foram: tempo de luminosidade, reciclo da biomassa após extração de lipídios e concentração de nutrientes ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e glicerol) no meio de cultivo, em um arranjo ortogonal de Taguchi  $L_8$ . De acordo com os resultados, identificou-se uma maior relevância, para a produtividade de biomassa, a utilização de glicerol e luminosidade (12 h), seguido do  $\text{NaNO}_3$  em alta concentração. A utilização de biomassa extraída mostrou-se inviável para o processo de cultivo, e a utilização de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram pouco influentes, porém essenciais. Paralelamente foi avaliado a viabilidade em se utilizar o efluente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) como meio de cultivo em um reator de PVC, construído para cultivo heterotrófico, no qual obteve-se uma alta produtividade de biomassa ( $0,20 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e de lipídios ( $83,35 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), se comparados a outros processos.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Nutrientes. Luminosidade. Reutilização da biomassa.

## ABSTRACT

MARINO, V. F. **Analysis of the cultivation parameters of the microalga *Chlorella vulgaris***. 2018. 65 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

The production of biofuels from microalgae has become promising because it is a renewable, non-polluting source and because it does not compete with food growing areas. Due to the exhaustion of fossil fuel sources and the high demand of fuel from renewable and non-polluting origin, microalgae have been attracting interest in the energy and environmental scenarios. On the other hand, there is a high cost to cultivate microalgae, making necessary studies for the development of new reactors, culture media, harvesting techniques, lipid extraction, transesterification and also the implementation of the biorefinery concept. Taking the growing interest in the use of microalgae as a raw material in the production of biofuels and the need of studies to make large-scale microalgae cultivation economically viable, this research aimed to determination of the best conditions for the cultivation of microalga *Chlorella vulgaris*, seeking a higher productivity of biomass and lipids. The factors evaluated were: time of luminosity, biomass recycling after lipid extraction and nutrient concentration ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and glycerol) in the culture medium using a orthogonal arrangement of Taguchi L8. According to the results, a greater relevance was identified for biomass productivity, the use of glycerol and luminosity (12 h), followed by  $\text{NaNO}_3$  in high concentration. The use of extracted biomass proved to be impractical for the process, and the use of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was weak but essential. In parallel, the feasibility of using the effluent of the Effluent Treatment Plant (ETP) on Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) as a culture medium for a PVC reactor, built for heterotrophic cultivation. It was obtained higher productivity of biomass ( $0.20 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) and lipids ( $83.35 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) from it, if you compare to others process

Keywords: *Chlorella vulgaris*. Nutrients. Brightness. Reuse of biomass.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostra de <i>Chlorella Vulgaris</i> .....	15
Figura 2 - (a) Ilustração da formação das células filhas de <i>Chlorella Vulgaris</i> .(b) Células filhas emergindo da célula mãe após rompimento da parede celular.....	16
Figura 3 - (a) Cadeia de ácidos graxos saturada a esquerda e insaturada a direita. (b) Triacilglicerol(lipídio neutro) a esquerda e Fosfolipídio(lipídio polar) a direita....	18
Figura 4 - Diagrama esquemático do mecanismo de extração de lipídios através de solventes.....	19
Figura 5a - Esquema de um reator tipo <i>raceway</i> .....	23
Figura 5b - Reator tipo Raceway instalação real.....	23
Figura 6 - Exemplos de diferentes tipos de reatores em sistemas abertos.....	24
Figura 7 - Exemplos da geometria de reatores de sistemas fechados.....	25
Figura 8 - Reação de Transesterificação de triglicerídeos.....	28
Figura 9 - Mecanismo de transesterificação catalisada por ácidos.....	29
Figura 10 - Remoção de nutrientes de águas residuais antes e depois.....	33
Figura 11 - Diagrama esquemático do cultivo de microalgas em laboratórios.....	34
Figura 12 - Cepário de manutenção de espécies da escola de Engenharia de Lorena.....	35
Figura 13 - Recipiente Transparente de 2L após 3 dias inoculado.....	36
Figura 14 - Ilustração do design do reator.....	37
Figura 15 - Reator tubular com <i>Chlorella Vulgaris</i> .....	39
Figura 16 - Experimento no escuro.....	41
Figura 17 - Reator de colunas em PVC.....	43
Figura 18 - Fotobioreator com bomba de refluxo .....	46
Figura 19 - Curva de calibração para concentração de biomassa .....	47
Figura 20 - Perfil de crescimento dos Experimentos .....	48
Figura 21 - Gráfico dos efeitos para do crescimento de Biomassa para modelo Razões S/N maior é melhor .....	50
Figura 22 - Perfil de crescimento de biomassa no reator de colunas em PVC .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de carboidratos de água residual de suínos em condições mixotrófica e heterotrófica.....	17
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos com variação de intensidade luminosa.....	20
Tabela 3 - Perfil de aminoácidos Chlorella Vulgaris.....	21
Tabela 4 - Composição do Meio Bold Basal (BBM).....	36
Tabela 5 - Parâmetros de controle e níveis usados para seleção das variáveis significativas no cultivo da microalga Chlorella Vulgaris.....	40
Tabela 6 - Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L8.....	40
Tabela 7 - Teste de Extração de Lipídios.....	45
Tabela 8 - Resultados de Biomassa e Lipídios para cada condição experimental...	48
Tabela 9 - Respostas de crescimento de Biomassa com Desvio Padrão e Erro.....	49
Tabela 10 - Anova do crescimento de Biomassa para modelo Razões S/N maior é melhor .....	50
Tabela 11 - Melhor condição para crescimento de biomassa para modelo Razões S/N maior é melhor.....	51
Tabela 12 - Comparativo dos meios de cultivo BBM e Efluente.....	52
Tabela 13 - Comparativo de BBM e Efluente para remoção de matéria orgânica....	52
Tabela 14 - Produtividade de lipídios no reator de colunas em PVC.....	53
Tabela 15 – Perfil de ácidos graxos segundo insaturações.....	54
Tabela 16 – Perfil de ácidos graxos .....	55
Tabela 17 – Propriedades do biodiesel segundo biodiesel analyzer.....	55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>13</b>
	2.1 Objetivo Geral	13
	2.2 Objetivos Específicos	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
	3.1 Microalgas em Bioenergia	14
	3.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	15
	3.2.1 Morfologia	15
	3.2.2 Composição	16
	3.2.3 Suplementação do meio de cultivo para obtenção da biomassa	21
	3.2.4 Tipos de Reatores	23
	3.2.5 Tipos de cultivos	25
	3.2.6 Colheita da biomassa	26
	3.3 Potenciais aplicações da biomassa microalgal na bioenergia	27
	3.3.1 Biodiesel	27
	3.3.2 Bioetanol	30
	3.3.3 Metanol e Biohidrogênio	31
	3.4 Uso de efluentes no cultivo da biomassa microalga	31
	3.5 Planejamento De Experimentos	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b>	<b>34</b>
	4.1 Cultivo da microalga	34
	4.2 Desenvolvimento do reator	37
	4.3 Teste de extração de Lipídios da <i>Chlorella vulgaris</i>	38
	4.4. Preparo da biomassa Extraída	38
	4.5 Teste utilizando a Matriz L8 de Taguchi	39
	4.6 Concentração de Biomassa	42

4.7 Teste Utilizando Efluente da Estação de Tratamento da EEL ..	42
4.7.1 Teste de viabilidade.....	42
4.7.1 Reator de coluna em PVC sem iluminação .....	42
4.8 Análise de perfil de ácidos graxos.....	43
4.9 Cálculo da produtividade de Lipídeos.....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 Teste de extração de Lipídios da <i>Chlorella vulgaris</i> : .....	45
5.2 Fotobioreator com bomba de refluxo .....	45
5.3 Matriz experimental de Taguchi .....	47
5.4 Teste da viabilidade do uso do Efluente da Estação de tratamento da EEL.....	52
5.4.1 Reator tubular em PVC .....	53
5.4 Perfil de ácidos graxos .....	54
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7 PRÓXIMAS ETAPAS .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso excessivo de energia fóssil pelos seres humanos (proveniente em sua maior parte do petróleo) vem causando ao meio ambiente descargas elevadas de CO<sub>2</sub> na atmosfera, em quantidades que o planeta não tem condições de assimilar a longo prazo, causando o efeito estufa. Além disso, os combustíveis fósseis estão se esgotando de uma forma previsível, sendo assim necessário a utilização de fontes de energias renováveis e ecologicamente viáveis, de modo a não agredir o meio ambiente e capazes de suprir as demandas energéticas de forma sustentável e com baixo custo (BAICHA et al., 2016).

Nesse contexto, as microalgas surgem como uma fonte emergente e promissora de energia renovável devido ao seu alto potencial de absorção de CO<sub>2</sub> e à taxa fotossintética consideravelmente maior que as plantas terrestres (Wang et al. 2010); de acordo com Chu (2012), as microalgas são capazes de absorver 9% da energia solar e produzir 280 toneladas de biomassa seca por hectare enquanto absorvem 580 toneladas de CO<sub>2</sub>, além da produção média de óleo de 22 vezes maior por unidade de área, se comparada com a produção de outras plantas (CHU, 2012).

Concomitantemente, é esperado que a demanda global por alimentos dobre nos próximos 50 anos e a demanda de combustíveis para transporte deve aumentar ainda mais rapidamente. Sendo assim, as microalgas (que não competem com áreas de produção de alimentos), podem ser utilizadas para produção de biodiesel, bioetanol, biohidrogênio e metanol (FENG; LI; ZHANG, 2011).

As microalgas são consideradas fontes potenciais para produção de biodiesel, sendo que algumas pesquisas relatam que as microalgas são claramente superiores às plantas terrestres para produção de biodiesel devido à sua capacidade de crescimento em efluentes gerando uma alta concentração de óleo (ABDUL; DURAIARASAN; SHELLOMITH, 2015).

Algumas microalgas como a *Chlorella vulgaris* são utilizadas para tratamento dos efluentes provenientes de esgotos municipais visando à diminuição de matéria orgânica, de compostos fosfatados e nitrados evitando assim a poluição e eutrofização dos sistemas aquáticos (EVANS et al., 2017).

Ademais, ainda que as microalgas possuam elevada produtividade lipídica, o seu cultivo energético em larga escala demanda elevado conteúdo de nutrientes. Nesse sentido, um dos desafios técnicos do cultivo de microalgas em escala industrial é a diminuição dos custos operacionais dos sistemas de produção (em *raceway*, foto biorreatores e reatores de painel do tipo *flat*), onde diferentes tipos de efluentes têm sido testados como fontes de água e nutrientes para a produção de microalgas, o que pode reduzir visivelmente os custos de produção (HE et al., 2016). A utilização de efluentes como meio de cultivo pode também melhorar o balanço energético e reduzir impactos ambientais associados à sua disposição em corpos d'água sem o tratamento prévio (LI et al., 2014; NECKEL et al., 2016).

O crescente interesse no estudo das microalgas deve-se à aplicação comercial das mesmas em diferentes campos tecnológicos (como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras). No cenário energético e ambiental, a elevada capacidade de acúmulo de lipídeos tornou esses micro-organismos promissores substratos para a produção de biodiesel.

Além do biodiesel, aplicações potenciais na utilização dos resíduos provenientes da extração dos lipídeos podem ser citadas, já que tais resíduos são geralmente ricos em carboidratos, proteínas e pigmentos, podendo ser convertidos em uma variedade de biocombustíveis como o biogás, bioetanol, biometano, biohidrogênio, dentre outros (PRAGYA et al., 2013; NEOFOTIS et al., 2016). Sendo assim, propostas de criação de biorefinarias vêm sendo apontadas na literatura, onde vários produtos poderiam ser obtidos e não apenas um, diminuindo-se então o custo de produção (LAM et al., 2017).

Buscando alternativas para reduzir os custos de produção da biomassa proveniente de microalgas, este trabalho visou avaliar a importância e os efeitos de determinados fatores nutricionais no meio de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* avaliando a quantidade de biomassa produzida e a porcentagem de lipídios nela presente. Além disso foram realizados teste utilizando efluente da estação de tratamento de esgoto da Universidade de São Paulo campus de Lorena como meio de cultivo para *Chlorella vulgaris*.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho, teve como objetivo principal determinar as melhores condições de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* buscando maiores produtividade de lipídios e biomassa e contribuir para o desenvolvimento de uma nova tecnologia.

### 2.2 Objetivos Específicos

Para que o objetivo geral descrito anteriormente fosse cumprido, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

I) Determinar a influência dos seguintes parâmetros de cultivo: Teor de Nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ); Teor de Fosfato Dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ); Teor de Fosfato Monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); Traços de Glicerol; Reciclo de biomassa após extração de lipídios; Tempo de Luminosidade.

Estes parâmetros foram avaliados utilizando uma matriz L8 de Taguchi sendo as variáveis resposta: Concentração de Biomassa e Teor de Lipídeos.

II) Avaliar o uso do efluente produzido pela Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) como meio de cultivo alternativo para a Microalga *Chlorella vulgaris*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microalgas em Bioenergia

As microalgas são seres unicelulares microscópicos (cujo tamanho varia em uma escala de nanômetros a milímetros) e fotossintéticos, encontrados principalmente em ambientes aquáticos (água salgada ou doce), podendo existir como organismos independentes ou em grupos/cadeias. Acredita-se que existam cerca de 100.000 espécies de microalgas, porém somente cerca de 35.000 destas foram caracterizadas. Suas populações podem ser divididas em filamentosas, fitoplâncton e ainda catalogada em classes: diatomáceas, alga verde, alga verde-azul e alga dourada (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017).

Estes organismos são, em sua maioria, autótrofos, utilizam energia luminosa e nutrientes inorgânicos (dióxido de carbono, nitrogênio, fosfato, etc) para sintetizar os componentes da sua biomassa como lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos, etc. No entanto algumas espécies de microalgas especiais são capazes de crescer em condições mixotrófica ou heterotrófica (MARKOU; NERANTZIS, 2013).

Consideradas como precursoras das plantas, as microalgas fazem parte dos organismos mais antigos do mundo. Uma espécie de microalga foi encontrada em uma rocha fossilizada por cerca de 3,4 bilhões de anos em *Western* (Austrália), sendo esta a microalga mais antiga pertencente a um grupo de cianobactérias. No entanto as microalgas encontradas atualmente são parecidas com as de 2,7 bilhões de anos e alguns pesquisadores acreditam que elas sejam os antecessores das plantas terrestres (SAFIA et al., 2014).

As microalgas têm despertado interesse no cenário energético e ambiental por apresentarem amplo potencial de aproveitamento, devido ao rápido crescimento, à elevada eficiência de conversão fotossintética, ao elevado teor de lipídeos e carboidratos (e capacidade de acúmulo dos mesmos), à produção não sazonal e à possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para culturas alimentares. Tais vantagens tornaram esses micro-organismos promissores substratos para a produção de combustíveis, sendo o biodiesel o mais explorado, visto que algumas espécies de microalgas têm elevado teor lipídico, podendo

produzir até 137000 litros de óleo por hectare, ao ano, em condições ótimas (POHNDORF et al., 2016).

De acordo com os estudos de Jankowska et al. (2017), ao comparar os rendimentos em óleo de uma microalga aquele produzido pela soja, os autores observaram que o desta última representa 0,8% do óleo produzido pela microalga em mesma área. Se comparado o rendimento com óleo de palma este representa 10,25% do produzido pela microalga em uma mesma área.

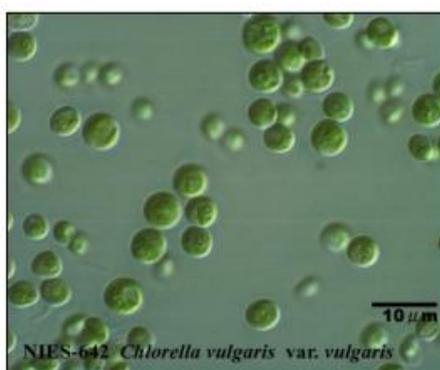
### 3.2 *Chlorella vulgaris*

SAFIA et al. (2014) destacam as principais aplicações da *Chlorella vulgaris*: além da nutrição humana e alimentação animal, esta microalga pode ser empregada no tratamento de efluentes, na produção de biofertilizantes e na produção de biocombustível, através da extração dos lipídeos. De acordo com Aquarone (2001) cerca de 0,40 gramas de lipídeos pode ser extraído, a cada grama da biomassa da *Chlorella vulgaris*.

#### 3.2.1 Morfologia

A *Chlorella vulgaris* apresenta forma esférica com diâmetro entre 2 à 10 µm contendo muitas estruturas similares às das plantas. A sua parede celular é rígida (já que apresenta glucosanima na sua composição) com espessura e composição variando de acordo com o seu estágio de crescimento. O citoplasma é composto, basicamente, por água, proteínas e minerais, e apresenta um único cloroplasto (SA et al., 2014). A Figura 1 apresenta uma amostra desta microalga.

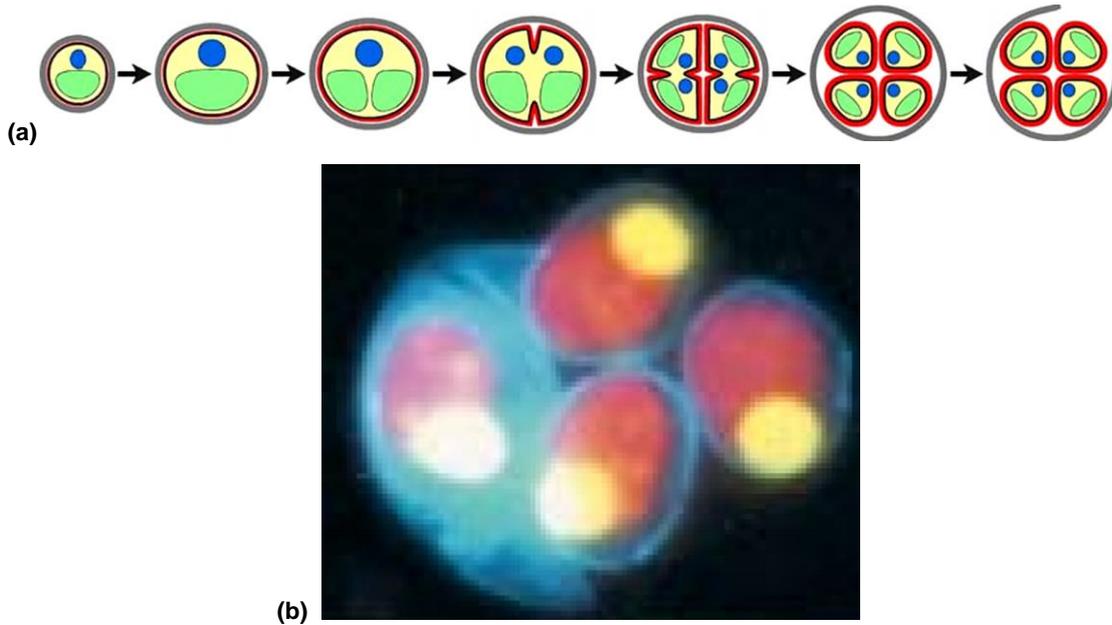
**Figura 1- Amostra de *Chlorella vulgaris***



Fonte: Lúcio (2014)

A reprodução da *Chlorella vulgaris* é assexuada, através de esporos, os quais crescem rapidamente, em média uma célula a cada 24h em condições ótimas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007), conforme as Figuras 2(a,b).

**Figura 2-** (a) Ilustração da formação das células filhas de *Chlorella vulgaris*. (b) Células filhas emergindo da célula mãe após rompimento da parede celular.



Fonte: (SAFIA et al., 2014)

### 3.2.2 Composição

Apesar da grande influência dos diversos fatores ambientais (temperatura, pH, iluminação, fotoperíodo, nutrientes, CO<sub>2</sub>), a composição das microalgas é, fundamentalmente: carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, sendo que as proporções variam amplamente entre as espécies e de acordo com as condições de cultivo (VIDOTTI, 2015).

a) **Carboidratos das microalgas:** os carboidratos representam o grupo de açúcares e polissacarídeos. O amido é o principal carboidrato presente na *Chlorella vulgaris* e atua como reserva de energia; já a celulose exerce um papel estrutural presente na parede celular, servindo como uma barreira protetora. A quantidade de

carboidratos na *Chlorella vulgaris* pode variar de 12 à 55% da biomassa seca dependendo da condição de cultivo (SAFIA et al., 2014).

Os carboidratos presentes na biomassa microalgal podem ser convertidos em bioetanol, através da hidrólise seguida por fermentação anaeróbia (KLEIN, 2013).

Os carboidratos presentes nas microalgas podem ser quantificados utilizando o método sulfúrico-fenol avaliando seu rendimento após hidrólise utilizando HPLC.(WANG et al., 2015)

A Tabela 1 apresenta o perfil de carboidratos da *Chlorella vulgaris* quando cultivada em água residual de suínos com diferentes diluições em condições mixotrófica e heterotrófica. Esta tabela visa apenas demonstrar um possível perfil de carboidratos, pois sabe-se que este perfil pode mudar de acordo com os nutrientes presente no meio de cultivo.

**Tabela 1- Perfil de carboidratos de água residual de suínos em condições mixotrófica e heterotrófica**

	Mixotrófico			Heterotrófico		
	5% Diluído	10% Diluído	20% Diluído	5% Diluído	10% Diluído	20% Diluído
<b>Carboidratos totais(%)</b>	58,300	46,000	46,000	54,000	44,300	44,800
<b>Glicose(%)</b>	54,900	43,000	46,600	49,600	41,100	44,800
<b>Xilose(%)</b>	2,300	2,000	0,000	2,400	21,000	0,000
<b>Arabinose(%)</b>	1,600	1,000	0,000	2,100	11,000	0,000
<b>Produtividade de Glicose(%)</b>	0,170	0,110	0,150	0,110	0,740	0,130
<b>Produtividade de Xilose(%)</b>	0,007	0,005	0,000	0,005	0,004	0,000
<b>Produtividade de Arabionose(%)</b>	0,005	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000

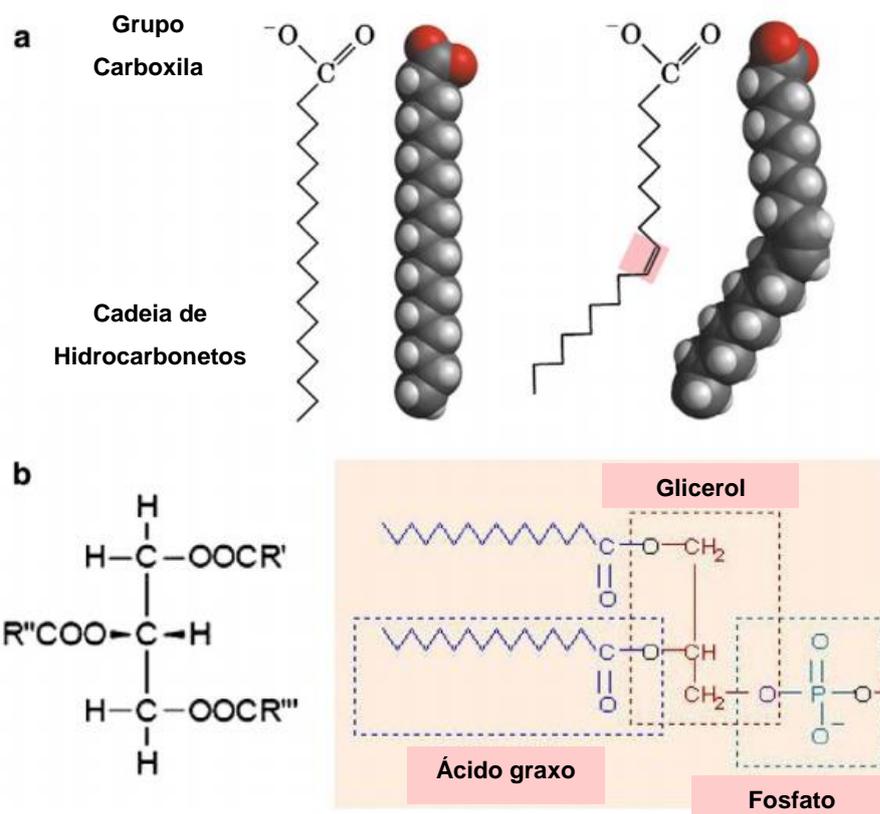
Fonte: Wang et al. (2015)

b) **Lipídios das microalgas (ácidos graxos):** definidos como grupos heterogêneos solúveis em solventes não polares e praticamente insolúveis em água, os ácidos graxos são constituídos por um grupo carboxila que termina em um hidrocarboneto hidrofóbico podendo ser saturado ou insaturado. Quando o grupo carboxila é ligado a um grupo sem carga (glicerol) uma molécula neutra (triacilglicerol) é formada; por outro lado, quando este grupo está associado a um grupo fosfato, um lipídio polar será formado, de acordo com Halim et al. (2012), conforme ilustrado na Figura 3.

As microalgas sintetizam os lipídeos a partir de uma fonte de carbono, a qual pode ser de origem inorgânica (como o  $\text{CO}_2$  presente no ar atmosférico ou a ele incorporado através da aquisição de cilindros) ou orgânica (acetatos, glicose, bicarbonato, etc) (HUANG et al, 2010). Quando cultivada em condições ótimas, a *Chlorella vulgaris* atinge cerca de 5 a 40% de lipídios em sua biomassa seca. Por outro lado, em condições desfavoráveis ao seu crescimento (condições de stress), tais microalgas podem apresentar cerca de 68% de lipídios (triacilgliceróis) em sua composição (SAFIA et al., 2014).

Os triacilgliceróis são sintetizados pelos cloroplastos e podem ser encontrados na parede celular e nas membranas das organelas (KNOSHAUG et al., 2016)

Figura 3 - (a) Cadeia de ácidos graxos saturada a esquerda e insaturada a direita. (b) Triacilglicerol (lipídio neutro) a esquerda e Fosfolipídio (lipídio polar) a direita.

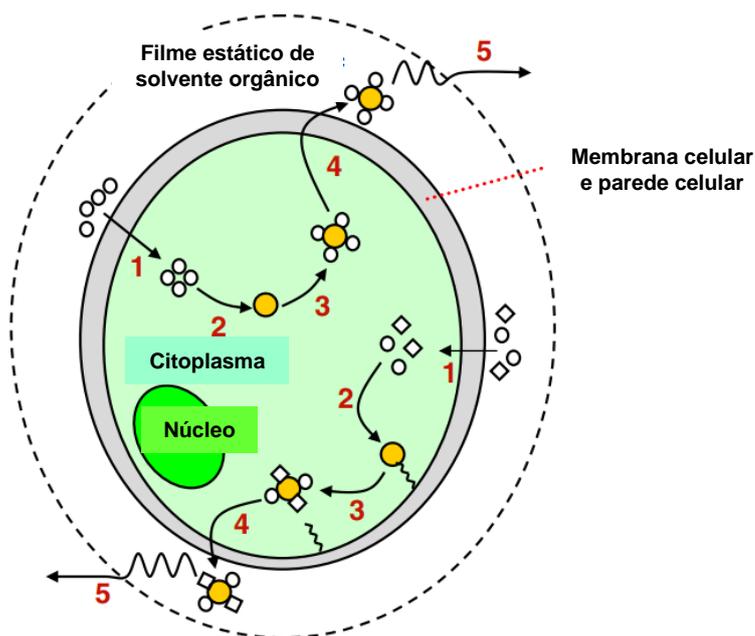


Fonte: (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012)

O Processo de extração de lipídios das microalgas é normalmente conduzido por uma mistura de metanol e clorofórmio de acordo com o método de Bligh and Dyer (1959). De acordo com Halim et al. (2012), este processo pode ser melhor dividido nas seguintes 5 etapas (representadas na Figura 4):

- 1- O solvente orgânico penetra através da membrana celular no citoplasma;
- 2- O solvente interage com os lipídios neutros com forças similares a de van der Waals;
- 3- Ocorre a formação de um complexo solvente orgânico lipídio;
- 4- Este complexo é conduzido através de um gradiente de concentração pela membrana celular;
- 5- Os lipídios neutros são extraídos da célula e permanecem dissolvidos no solvente orgânico.

**Figura 4 - Diagrama esquemático do mecanismo de extração de lipídios através de solventes.**



Fonte: Halim et al. (2012)

Normalmente, para o acúmulo de lipídios, utiliza-se um meio com baixa concentração de nitrato, porém é possível dividir em dois períodos no qual primeiramente é adicionado uma alta concentração de nitrato e baixa luminosidade para crescimento celular e uma segunda etapa na qual a intensidade luminosa é aumentada. Na tabela 2 é possível verificar o perfil de ácidos graxos da *Chlorella vulgaris* com a variação da intensidade luminosa (LIAO et al., 2017).

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos com variação de intensidade luminosa.

Composição de Ácidos Graxos	Intensidade Luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )					
	160	260	360	460	560	660
C16:0	30,77	23,25	27,22	27,89	26,19	31,03
C16:1	5,36	5,67	2,22	2,89	2,28	2,15
C16:2	0,79	0,53	0,51	0,57	0,28	0,33
C16:3	4,20	4,81	4,59	4,09	4,45	4,08
C18:0	4,06	5,96	1,56	1,62	0,13	0,34
C18:1	21,34	24,8	35,88	35,37	39,00	35,87
C18:2	23,03	22,00	16,03	15,55	16,75	15,30
C18:3	6,64	8,08	8,12	7,45	8,16	8,33
Ácidos Graxos Saturados	34,83	29,21	28,78	29,51	26,32	31,37
Ácidos Graxos Monoinsaturados	26,70	30,47	38,10	38,26	41,28	38,02
Ácidos Graxos Poliinsaturados	34,66	35,42	29,25	27,66	29,64	28,04

Fonte: Liao et al. (2017)

Os lipídeos extraídos da biomassa microalgal são amplamente destinados à produção do biodiesel, onde tal conversão ocorre, normalmente, por transesterificação ácida ou básica (DEMIRBRAS, 2010).

c) **Proteínas das microalgas:** as proteínas têm uma importância determinante na composição química das microalgas, estando as mesmas envolvidas no crescimento, recuperação e manutenção das células assim como em atividades reguladoras e de proteção da célula contra invasores (JIANG; KALODIMOS, 2017).

Representando, em média, 42 a 58% (de acordo com a condição de cultivo) da composição da biomassa seca da microalga, 20% das proteínas estão presentes na parede celular, 50% internamente e 30% migram para dentro e fora da célula. Para o acúmulo de proteínas, recomenda-se a produção heterotrófica dividida em um período de baixa e alta concentração de nitrato. (XIE et al., 2017)

Para a extração de proteínas utiliza-se a mesma técnica para praticamente todas microalgas na qual as proteínas são solubilizadas em uma solução alcalina e então purificadas por precipitação utilizando ácido tricloroacético 25% ou ácido clorídrico 0.1N (URSU et al., 2014). O perfil de aminoácidos da *Chlorella vulgaris* é representado na Tabela 3.

Tabela 3 - Perfil de aminoácidos *Chlorella vulgaris*

Composição de Aminoácidos	Biomassa
ácido aspártico	8,6
Treonina	5,5
Serina	4,4
ácido glutâmico	10,3
Prolina	5,0
Glicina	7,0
Alanina	10,7
Valina	6,7
Metionina	2,6
Citosina	1,3
Isoleucina	3,4
Leucina	8,2
Tirosina	4,4
Fenilalanina	6,0
Histidina	1,6
Lisina	5,4
Arginina	7,4
Triptofano	0,2
Amônia	1,3

Fonte: (URSU et al., 2014)

d) **Pigmentos:** a *Chlorella vulgaris* apresenta uma quantidade abundante de clorofila (cerca de 1 à 2% da biomassa seca), além de quantidades consideráveis de carotenoides ( $\beta$ -caroteno) (FERNÁNDEZ-LINARES et al., 2017).

### 3.2.3 Suplementação do meio de cultivo para obtenção da biomassa

A *Chlorella vulgaris* é considerada uma das espécies mais adequadas para a produção de biomassa, visando à geração de biocombustíveis, pelo fato de ser extremamente resistente às condições adversas e contaminantes, além de não necessitar de grandes quantidades de nutrientes, resultando em uma alta produtividade de biomassa (YEH; CHANG, 2012).

No entanto, para qualquer espécie microalgal, os fatores nutricionais são de grande importância para o seu pleno desenvolvimento, o qual necessita de macronutrientes essenciais, micronutrientes e vitaminas (GUILLARD, 1975). De acordo com Lourenço (2006), os macronutrientes desempenham funções de

grande importância nas microalgas, tais como as funções estruturais, metabólicas e de troca de energia. O autor classifica como macronutrientes: carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio e ferro.

- Carbono: com relação à concentração de CO<sub>2</sub>, o mesmo está presente no ar atmosférico em baixa concentração, o que pode limitar o crescimento rápido, uma vez que o carbono corresponde à cerca de 45% da biomassa das microalgas. Portanto, para que elevadas taxas de crescimento possam ser alcançadas, esse carbono geralmente necessita ser suplementado (ANTONIO, 2014).

Zhao et al. (2015), ao analisarem os efeitos da concentração de CO<sub>2</sub> no rendimento em biomassa da *Chlorella sp*, cultivada em reatores do tipo colunas de bolhas, chegaram à conclusão de que o aumento na concentração de CO<sub>2</sub> (quando esta variou de 10 a 20) exerceu efeito negativo no crescimento microalgal. Paralelamente, Antonio (2014), ao avaliar o efeito do CO<sub>2</sub> na produção lipídica de *Chlorella vulgaris*, constatou que a máxima produtividade em lipídios totais foi alcançada quando utilizou-se 10% de CO<sub>2</sub>. No entanto, a influência deste parâmetro (teor de CO<sub>2</sub> na corrente gasosa) vai depender fortemente da espécie microalgal, tanto no que diz respeito à produtividade em biomassa quanto ao teor de lipídeos e à composição em ácidos graxos (CHIU et al., 2015).

Quando em condições mixotrófica ou heterotrófica, o glicerol, este serve de fonte de carbono para as microalgas, dando continuidade ao crescimento, mesmo no escuro. Tendo em vista que o glicerol é um resíduo da transesterificação de lipídios em biodiesel, a utilização deste composto pode ser uma forma de reduzir custo para o cultivo das microalgas (DANTAS, 2006; SHARMA, SINGH and UPADHYA, 2008).

- Nitrogênio: de acordo com dados da literatura, se o tal suprimento é abundante nos cultivos, verifica-se a tendência de aumento nas concentrações proteica e de clorofila nas células (LOURENÇO, 2006); por outro lado, o nitrato em baixas concentrações pode gerar o acúmulo de lipídios em até 70% da biomassa seca (CHU, 2012; LI et al., 2016).

- Fósforo: a utilização de fosfato no meio de cultivo é importante, visto que a escassez deste nutriente pode afetar o seu crescimento da microalga, reduzindo a síntese e regeneração de substratos no ciclo de Calvin-Benson e, conseqüentemente, reduzindo a capacidade de absorção de luz e fixação de gás

carbônico. A ausência de fósforo reduz a quantidade de proteínas e clorofila e aumenta a quantidade de carboidratos na célula. Além disso, fosfato é importante para constituição de DNA, RNA e proteínas da célula. (BAIEE, 2016).

### 3.2.4 Tipos de Reatores

#### a) Sistemas Abertos

Os principais arranjos dos reatores abertos são os tanques retangulares e circulares do tipo *raceway*, representados na figura 5a e 5b.

Normalmente, cultivos de microalgas em reatores abertos são realizados em locais próximos às indústrias com alta descarga de gás carbônico (SU et al., 2017; SA et al., 2014).

Figura 5a - Esquema de um reator tipo *raceway*

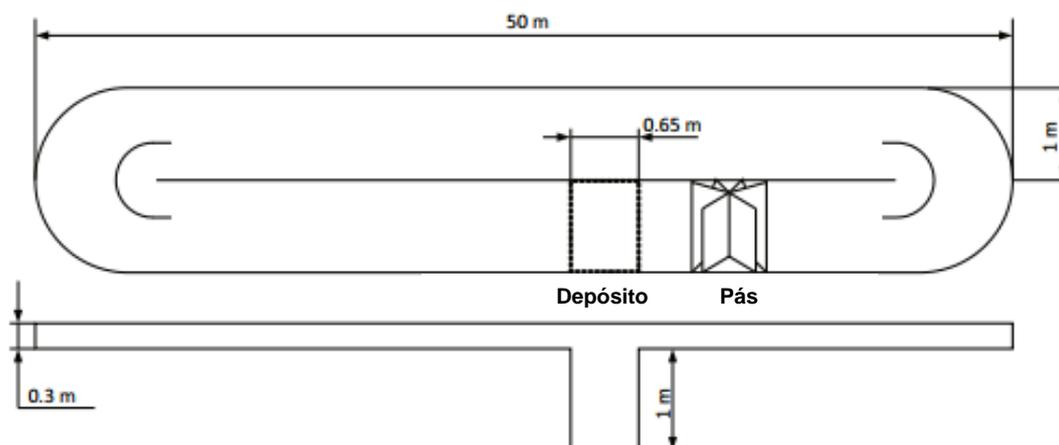


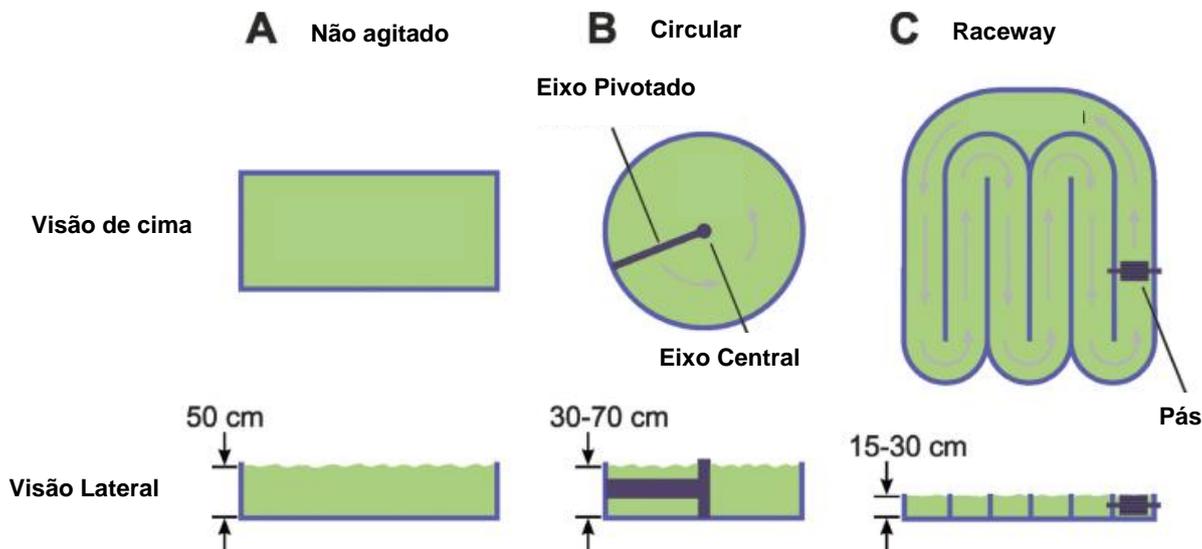
Figura 5b - Reator tipo Raceway instalação real.



Fonte: (PAWLOWSKI et al., 2015)

Na Figura 6 é possível verificar alguns diferentes tipos de reatores de sistemas abertos, onde mais detalhes sobre esses reatores podem ser encontrados no trabalho de Hallmann and Hallmann (2016).

Figura 6 - Exemplos de diferentes tipos de reatores em sistemas abertos



Fonte: (HALLMANN; HALLMANN, 2016)

Apesar do menor custo de construção e operação, ainda não se pode dizer que este é o sistema mais viável de produção, uma vez que estes sistemas precisam de um controle do ambiente para evitar o risco de contaminações, além do difícil controle de temperatura, exposição a luz e concentração de gás carbônico no ambiente. Esses sistemas apresentam uma baixa produção de biomassa entre 10 a 25g de massa seca por  $m^2$  (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017).

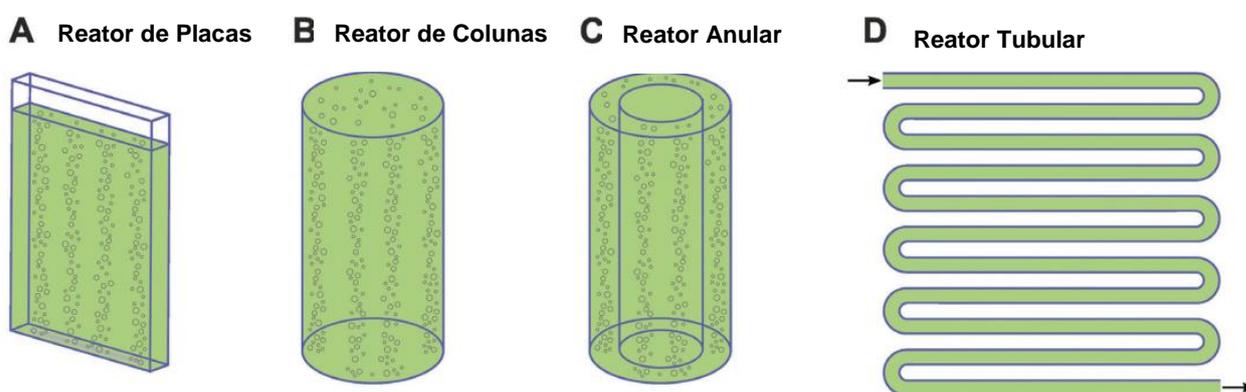
### b) Sistemas Fechados

Nos sistemas fechados normalmente empregam-se reatores do tipo coluna de bolhas, *Air Lift* e arranjos tubulares espirais (PEREIRA et al., 2012). Deste modo, os sistemas fechados foram implementados buscando melhorar alguns fatores limitantes dos sistemas abertos como pH, intensidade de luz, concentração de gás carbônico e temperatura, sendo assim possível obter maiores concentrações e uma biomassa mais apropriada para a devida aplicação, podendo-se obter cerca de 20g à 100g de biomassa seca por  $m^2$  (JANKOWSKA et al, 2017).

Nesses sistemas fechados é utilizado luzes fluorescentes e o gás carbônico é borbulhado atrás de tubos ou compressores de ar. Normalmente apresentam formatos tubulares transparentes com diâmetro de 20 cm para absorção de luz com isso esses sistemas tem a desvantagem devido ao custo de construção e luzes fluorescentes, além do alto custo de construção e operação destes sistemas. (SU et al., 2017)

Na Figura 7 é possível verificar alguns diferentes tipos de reatores de sistemas fechados, onde mais detalhes sobre esses reatores pode ser encontrado no trabalho de Hallmann and Hallmann (2016).

**Figura 7 - Exemplos da configuração de reatores de sistemas fechados**



Fonte: (HALLMANN; HALLMANN, 2016)

### 3.2.5 Tipos de cultivos

As condições de cultivo, dependem do tipo de metabolismo da microalga que, de acordo com a literatura, podem ser de três tipos principais de metabolismo: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (PEREZ-GARCIA et al., 2010).

a) **Crescimento autotrófico:** neste tipo de metabolismo, a microalga utiliza a luz como fonte única de energia que é convertida em energia química por meio de reações fotossintéticas. A produção destes organismos autotróficos é realizada em sistemas iluminados, tais como os fotobiorreatores (sistemas fechados) ou as lagoas fotossintéticas (sistemas abertos) e, para que a taxa de crescimento e a produtividade sejam mais elevadas, as microalgas necessitam de condições de cultivo adequadas (PEREIRA et al., 2012).

**b) Crescimento Heterotrófico:** nesse caso, as microalgas utilizam apenas compostos orgânicos dissolvidos como fonte de carbono e energia. Ou seja, o crescimento se dá na ausência de luz e presença de fontes de carbono. Shen et al. (2016) testaram glicose, acetato, glicerol e glutamato como fonte de carbono para a *Chlorella vulgaris* e verificaram que a glicose foi a fonte que mais favoreceu o crescimento. Segundo os autores, a desvantagem desse processo é que apresenta um baixo rendimento de crescimento se comparado com o crescimento autotrófico e também devido a competição das fontes de carbono como alimento ou produção de biocombustíveis.

b) **Crescimento Mixotrófico:** essa forma de crescimento é uma combinação de metabolismo autotrófica e heterotrófica. Ou seja, os micro-organismos mixotróficos conseguem simultaneamente realizar a fotossíntese e consumir carbono inorgânico e orgânico, o que permite aumentar a sua produtividade. A *Chlorella vulgaris* é capaz de combinar essas técnicas melhorando sua performance competindo assim diretamente com o crescimento autotrófico (MIAO et al., 2016).

### 3.2.6 Colheita da biomassa

Ao final do período de cultivo, a água contida na biomassa microalga deve ser removida, antes de se prosseguir com processamento dos biocombustíveis. A colheita da biomassa é uma das etapas de maior custo (representando cerca de 20 a 30% do custo final do biocombustível). Os principais métodos de colheita da biomassa em microalgas são: centrifugação, floculação e filtração ou combinação destas para então secagem da biomassa cultivada (DEMIRBRAS, 2010).

**a) Centrifugação:** trata-se de um processo efetivo no qual 95% da biomassa é recuperada sem que sua estrutura seja comprometida além de ser um processo rápido. É aplicável a espécies de baixa densidade (SA et al., 2014).

**b) Floculação:** algumas microalgas podem auto flocular; porém na sua grande maioria é necessário a utilização de algum agente floculante aumentando o pH para que a floculação ocorra. Trata-se de um processo de baixo custo, sendo o

Hidróxido de Sódio e Sulfato de Alumínio, os agente flocculantes utilizados com maior frequência (CHATSUNGNOEN and CHISTI, 2016; LAMA et al., 2016).

Após a floculação o sobrenadante é descartado e o restante filtrado para obtenção da biomassa concentrada.

**c) Filtração:** Para filtração utiliza-se o concentrado de biomassa obtido da floculação e passa-se por um microfiltro, sendo a biomassa retirada da membrana filtrante seca até a umidade desejada para as próximas etapas (BARROS, et al., 2015).

### **3.3 Potenciais aplicações da biomassa microalgal na bioenergia**

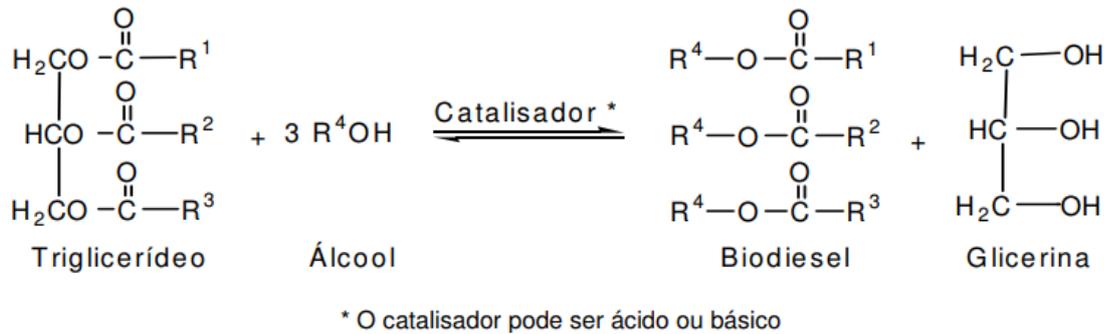
Conforme relatado no item 3.1, dentre as possibilidades de utilização da biomassa de microalgas está a geração de biocombustíveis. Os estudos recentes apontam as microalgas como a matéria prima preferencial para a produção de biocombustíveis em relação à outras culturas (plantas terrestres), devido a diversos fatores, tais como: maior produtividade por área de terreno (decorrente da maior eficiência fotossintética); maior capacidade de remoção de dióxido de carbono; facilidade de manuseio; versatilidade em relação à utilização da água, resultando na redução dos custos de nutrientes e/ou despoluição dos cursos de água; possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para crescimento de culturas alimentares; produção não sazonal; possibilidade de estimulação para acúmulo de óleos e/ou glicídios (GODOS et al., 2010; KIM et al, 2010; KONG et al., 2010). Tais vantagens tornaram esses micro-organismos promissores substratos para a produção de combustíveis, sendo o biodiesel o mais explorado, visto que algumas espécies de microalgas têm elevado teor lipídico, podendo produzir até 137000 litros de óleo por hectare, ao ano, em condições ótimas (POHNDORF et al., 2016).

#### **3.3.1 Biodiesel**

Dentre todas as alternativas de conversão do óleo microalga em biodiesel, a transesterificação pode ser considerada como a melhor alternativa, visto que se trata de um processo relativamente simples e as características físicas e químicas

dos ésteres de ácidos graxos (biodiesel) são muito semelhantes às do óleo diesel (CAVALCANTE et al, 2016). A Figura 8 representa o esquema de uma reação de transesterificação de triglicerídeos.

**Figura 8 - Reação de Transesterificação de triglicerídeos**



Fonte: VOLTZ (2009).

De acordo com Hidalgo et al. (2013) a transesterificação dos lipídeos extraídos a partir da biomassa microalgal para a produção de biodiesel pode ser realizada por catálise homogênea tanto alcalina quanto ácida, de modo que cada método apresenta suas particularidades e vantagens. Sabe-se que para a obtenção da reação de transesterificação catalisada por base, é preciso que os óleos possuam um valor do índice de acidez menor que 3%, pois quanto mais elevado for índice de acidez do óleo, menor é a eficiência da conversão, pois pode ocorrer a formação do sabão (SERRA, 2010; CONCEIÇÃO et al., 2008), visto que altos índices de acidez e umidade, reduzem o rendimento da reação. Além disso, a transesterificação também pode ser realizada por catálise heterogênea, também alcalina ou ácida. O inconveniente deste processo é a alta demanda de energia requerida.

Segundo Mathimani, et al. (2015), as condições reacionais, aliadas ao agente de catálise, podem influenciar na taxa de transesterificação, de modo que o tempo de reação, a velocidade de agitação e a temperatura devem ser ajustadas ao processo. Além disso, estes autores reportaram que a catálise homogênea ácida para a conversão de lipídeos de *Chlorella sp.* a ésteres e via transesterificação, foi a mais eficiente quando comparada com a catálise homogênea alcalina e catálise heterogênea. Ainda, as catálises realizadas com ácido sulfúrico como catalisador

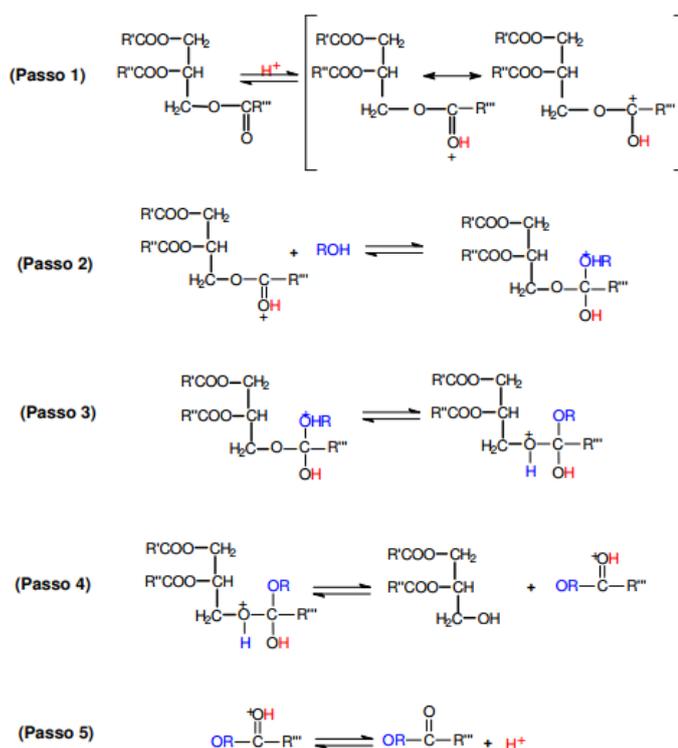
apresentaram maior eficiência de conversão, quando comparado com os demais ácidos utilizados como catalisadores.

A Figura 9 representa o mecanismo de transesterificação ácida de um glicerídeo, o qual envolve as seguintes etapas:

- (1) ativação da carbonila tornando possível;
- (2) ataque nucleofílico do álcool;
- (3) adição no nucleófilo permitindo;
- (4) a eliminação do diglicerídeo;
- (5) desprotonação, levando à formação do biodiesel.

O método acima descrito leva a altos rendimentos; por outro lado, é necessária uma alta concentração molar de álcool/óleo além de ser uma reação demorada, outro fator que deve ser controlado é a presença de água que pode gerar uma reação secundária reduzindo o rendimento da reação (GARCIA and SCHUCHARDT, 2006).

**Figura 9 - Mecanismo de transesterificação catalisada por ácidos**



Fonte: GARCIA and SCHUCHARDT (2006).

Além do biodiesel, aplicações potenciais na utilização dos resíduos provenientes da extração dos lipídeos podem ser citadas, já que tais resíduos são geralmente ricos em carboidratos, proteínas e pigmentos, podendo ser convertidos em uma variedade de biocombustíveis como o biogás, bioetanol, biometano, biohidrogênio, dentre outros. (PRAGYA et al., 2013; NEOFOTIS et al., 2016) De acordo com Zhu et al. (2014), a produção de etanol e biogás a partir dos resíduos de biomassa gerados em processos como a extração lipídica, pode aumentar a produtividade energética total e representa uma medida fundamental para ambos os aspectos, econômico e energético, em equilíbrio.

### **3.3.2 Bioetanol**

O etanol é hoje a principal bioenergia utilizada no mundo. Entre 2000 e 2010, a produção mundial de etanol cresceu aproximadamente 317 %, atingindo 92 bilhões de litros, dos quais quase 73 % foram usados como combustível (Silva, 2014). Os maiores produtores e consumidores do etanol são o Brasil e os Estados Unidos que, juntos, foram responsáveis por quase 90 % da produção e do consumo mundial em 2011, seguido pela China (8,9 %), pela União Europeia (5,3 %) e pela Índia (4 %), que utilizam o biocombustível misturado à gasolina em diferentes percentuais (UNICA, 2011).

No Brasil, para a produção do etanol, a cana-de-açúcar é atualmente a principal matéria-prima utilizada, sendo 1 tonelada de cana suficiente para produzir 85 litros de álcool (BEN, 2004). No entanto, a busca por novas matérias-primas para produção de etanol, assim como a tecnologia industrial utilizada para fontes amiláceas, já faz parte da agenda dos países detentores de alta tecnologia, como Alemanha, Dinamarca, Bélgica, Suécia, França e Estados Unidos, desde o final da década de 90. (SILVEIRA, 2008)

Entretanto, um ponto controverso deve-se ao fato da produção de "biocombustíveis de primeira geração" competir diretamente com a produção de alimentos ao utilizar matérias-primas nobres e de uso alimentar e, mesmo caso não desloque alimentos para uso energético, deslocam a produção de alimentos ao ocupar terras férteis, que poderiam ser utilizadas para o cultivo. Neste contexto, os resíduos despertam grande interesse, apresenta algumas vantagens,

principalmente econômicas e ambientais, tais como o uso de insumos de baixo custo, evita o indesejado acúmulo dessas biomassas no meio ambiente, e sua utilização pode ser implantada sem que haja competição direta com a alimentação humana. (PANDEY et al., 2000; VINIEGRA-GONZALEZ et al., 2003)

Alguns critérios devem ser considerados na escolha da matéria-prima para obtenção do etanol, destacando-se a produtividade do processo, o custo de produção, os requisitos de qualidade de solo e clima para a produção em larga escala da matéria-prima, os resíduos gerados no processo com valor energético, a sazonalidade, os usos alternativos dos resíduos e da matéria-prima, o nível de difusão da cultura, o nível tecnológico e os impactos ambientais (LEITE and LEAL, 2007). Nesse contexto, as microalgas apresentam todos os requisitos, uma vez que as mesmas apresentam altas quantidades de amido (cerca de 50% da biomassas seca) que podem ser convertido em hidrolisado de glicose para fermentação à etanol. A técnica que vem sendo utilizada é a extração dos lipídios antes da hidrólise que pode ser acida ou enzimática, para então fermentação da glicose à etanol.(BAICHA et al., 2016)

### **3.3.3 Metanol e Biohidrogênio**

De acordo com Baicha et al. (2016), a genética metabólica e enzimática das microalgas tem características que permitem a produção de hidrogênio através do processo fotossintético da água com a luz do sol. Hidrogênio pode ser produzido de diferentes formas mas as mais comuns são Biophotólise direta, Biophotólise indireta e por fermentação escura. De acordo com os autores, o metanol também pode ser produzido a partir das microalgas, através da digestão anaeróbica da biomassa após a extração dos lipídios convertendo cerca de 55 à 75% em metanol e 25 à 45% a dióxido de carbono por microrganismos anaeróbicos.

## **3.4 Uso de efluentes no cultivo da biomassa microalga**

O termo efluente é utilizado para designar qualquer resíduo líquido resultante dos processos industriais, podendo ser gerado na planta ou então usado como insumo. A crescente demanda por produtos e serviços tem elevado drasticamente a atividade industrial, gerando cada vez mais esses resíduos, cuja composição

pode variar de acordo com sua origem, podendo conter grande quantidade de matéria orgânica ou ainda apresentar altas concentrações de metais tóxicos, representando um grave problema para o meio ambiente (QUINTELAS et al., 2008; YANG et al., 2011).

Frente à essa problemática, busca-se aliar desenvolvimento econômico com proteção ambiental, na qual têm-se intensificado os estudos baseados em processos biológicos para tratamento de efluentes, surgindo assim a biossorção. Esse processo apresenta-se como tecnologia promissora e em expansão, com baixo custo e alta eficiência (ZHU et al., 2014).

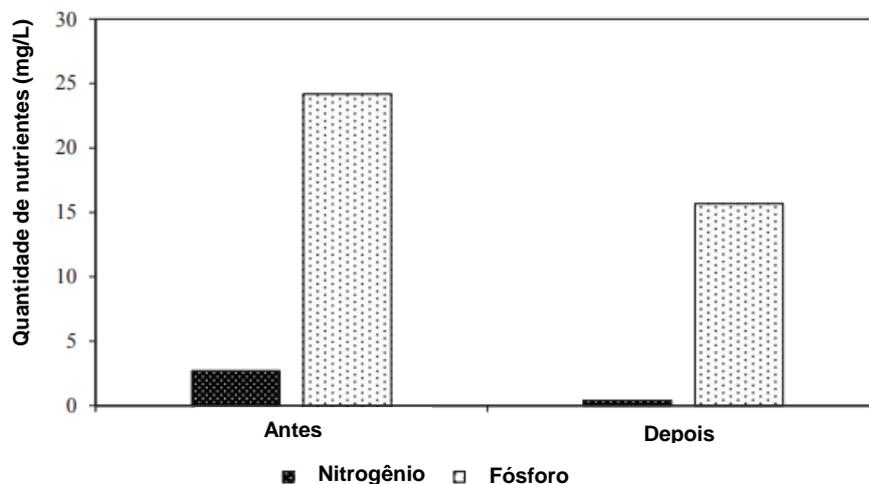
Dentre os micro-organismos utilizados na biossorção, as microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas envolvendo tratamento de efluentes, em função da sua capacidade de retenção e imobilização de metais (SCHMITZ et al., 2012; TANGO, 2015).

O uso de efluentes no cultivo de microalgas, é benéfico para melhoria da qualidade da água, visto que as microalgas tem a capacidade de remover nitrogênio e fosfato do efluente, e então produzir biocombustível de sua biomassa (MUJTABA and LEE, 2017).

Muitos estudos demonstram o potencial de *Chlorella vulgaris* em absorver nutriente como nitrogênio, fosforo, gás carbônico, metais pesados e patógenos de efluentes de esgotos, municipais, agrícolas e outros reduzindo a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) melhorando assim a qualidade da água deste efluente (MIAO et al., 2016).

Uma demonstração do potencial de remoção de nitrato e fosfato das águas residuais é esboçado na Figura 10.

A potencial produção de biomassa de microalgas com alto teor de lipídios em efluentes pode ser demonstrada em alguns trabalhos na literatura. Por outro lado, os seguintes fatores devem ser considerados: necessidade de esterilização do efluente (devido a possibilidade de crescimento de fungos e bactérias), a dificuldade de produção em alta escala (devido ao alto custo de produção) e variações na composição dos nutrientes do meio de cultivo. Sendo assim, torna-se necessário desenvolver técnicas mais aperfeiçoadas para pós o cultivo de coleta e extração de lipídios com menor custo (CHIU et al., 2015).

**Figura 10 - Remoção de nutrientes de águas residuais antes e depois**

Fonte: (KEE et al., 2017)

### 3.5 Planejamento De Experimentos

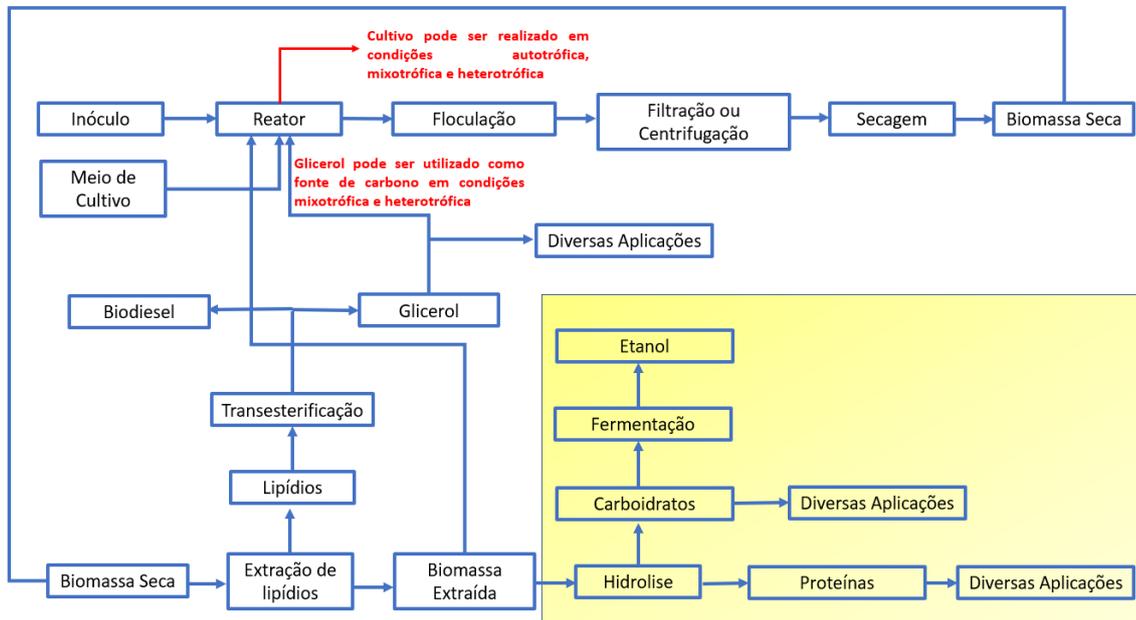
O método de Taguchi foi desenvolvido por Genichi Taguchi como uma forma de conduzir experimentos e reduzir seus custos. Este método permite determinar a melhor combinação de fatores determinantes para o processo, através de arranjos ortogonais, com um número reduzido de experimentos. O arranjo ortogonal adequado é determinado de acordo com o número de fatores que se deseja avaliar no experimento; tais fatores normalmente são determinados da literatura, estudos anteriores ou por experiência em um determinado processo (HUANG; HUNG; YANG, 2016; DELIA; GRIGORE; MIRCEA, 2014).

## 4 MATERIAIS E METODOS

### 4.1 Cultivo da microalga

Visto que a utilização das microalgas na bioenergia tem-se mostrado promissora, ainda existe a necessidade em se atingir um maior potencial comercial dos biocombustíveis gerados por elas. Nesse sentido, a Figura 11 representa as etapas mais importantes, realizados no Laboratório de Engenharia de Microalgas da EEL de forma geral, de uma biorefinaria a partir da biomassa microalgal, porém este presente trabalho utiliza a biomassa extraída reciclando-a para o reator, não sendo o foco utilizar a biomassa extraída para etapa de hidrólise, como representado na Figura 11. O glicerol utilizado, será o de padrão analítico, sendo que a Figura 11 visa apenas representar a possibilidade de ciclo do glicerol ao reator. Maiores detalhes de cada etapa do cultivo, até a obtenção da biomassa rica em lipídios, são descritos a seguir.

**Figura 11 - Diagrama esquemático do cultivo de microalgas em laboratórios em geral.**



**Fonte: o autor**

De acordo com o esquema representado na figura 11, antes de prosseguir com o cultivo da microalga em reatores, torna-se necessário a repicagem do inóculo inicial em períodos regulares e, uma vez que a biomassa atingiu considerável concentração (m/v), a mesma passa a ser cultivada em reatores.

Buscando aumentar o banco de microalgas no Laboratório de Engenharia de Microalgas e, de modo a implementar algumas microalgas de água doce, foram implementadas as seguintes espécies: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus ecornis*, *Botryococcus terribilis*, *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*, cujas cepas foram gentilmente doadas pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo e pelo Departamento de Botânica – Laboratório de ficologia da Universidade Federal de São Carlos. Para isso foi construído um cepário utilizando cerca de quatro erlenmeyers de 250mL com um volume de 150mL de meio de cultivo autoclavado para cada espécie, empregando um fotoperíodo de 12h no claro e 12h no escuro para manutenção das cepas, conforme representado na figura 12.

**Figura 12 - Cepário de manutenção de espécies do LAB de microalgas da EEL.**



**Fonte: autor**

Após a etapa de adaptação, optou-se pelo cultivo da *Chlorella vulgaris* para desenvolvimento desde trabalho, devido à sua capacidade de crescimento em condições autotrófica, mixotrófica ou heterotrófica, crescimento em efluentes e também pelo auto acúmulo de lipídios citados na literatura.

A cepa da microalga *Chlorella vulgaris* foi mantida no cepário, dotado de um fotoperíodo, controlada por um temporizador. A intensidade luminosa fornecida foi de 11 W por uma lâmpada de LED.

Para a manutenção do cultivo mãe, foi utilizado o Meio Bold Basal (Tabela 4), conforme recomendado pelo Departamento de Oceanografia Biológica do

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, onde todos os reagentes utilizados no seu preparo foram de padrão analítico. As soluções de estoque, utilizadas para preparar o meio de cultivo, foram autoclavadas.

**Tabela 4 - Composição do Meio Bold Basal (BBM)**

Reagentes	Conc. Final (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	0,75000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,07500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17500
NaHCO <sub>3</sub>	0,07500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01300
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05000
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,05000
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00400
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00400
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00150
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00024
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00024
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00006
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00020

**Fonte: Lorenço (2006)**

O repique das células, foi feito em recipientes transparentes de 2 L (onde foi colocado 1,75 L de meio e inoculado com 150 mL de inóculo do cepário), com fotoperíodo de 24h e luminosidade média de 4,8 klux. Neste momento adicionou-se um compressor de ar para promover agitação e um crescimento mais rápido.

As repicagens foram feitas em períodos de 10 a 15 dias e está representado na Figura 13.

**Figura 13 - Recipiente Transparente de 2L após 3 dias inoculado.**

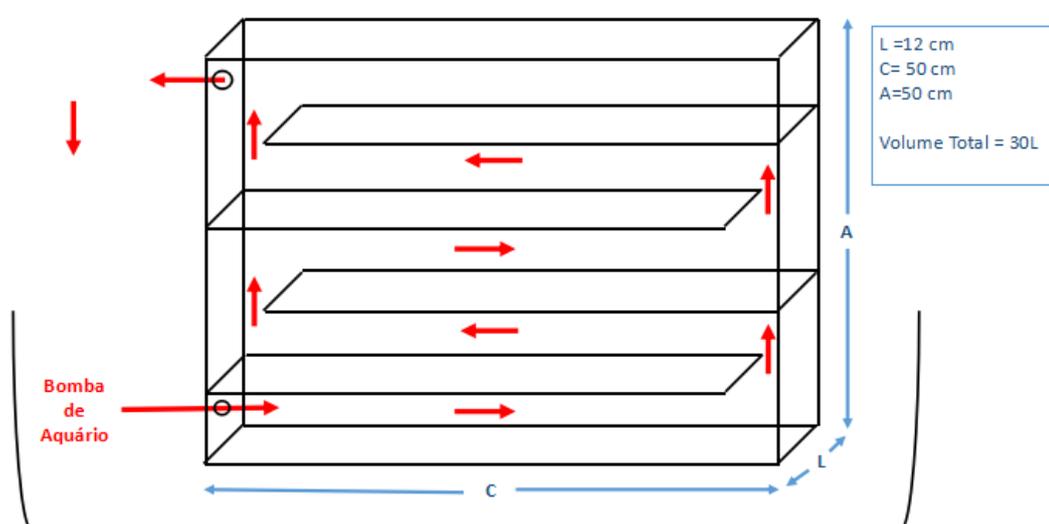


**Fonte: autor**

## 4.2 Desenvolvimento do reator

Buscando aumentar o tempo de residência das bolhas, foi desenvolvido um reator de 4 “pratos”, de vidro, onde buscou-se uma melhor configuração para o crescimento das microalgas. O reator foi construído no Laboratório de Engenharia de Microalgas, utilizando placas de vidro de 5 mm de espessura, silicone, e “pratos” de acrílico com espessura de 3 mm sendo que sua configuração está representada na Figura 14.

Figura 14 - Ilustração do design do reator.



Fonte: o autor.

O reator ilustrado na Figura 14 tem a intenção de aumentar o tempo de residência das bolhas no seu interior devido a utilização de 4 “pratos” para sua retenção; tais bolhas podem ser geradas pela turbulência da água ao cair sobre a bomba ou por conta do compressor no seu interior, sendo as primeiras de diâmetro bem menor, se comparadas às bolhas do compressor (o que teoricamente seria melhor para solubilização de gás carbônico e oxigênio presentes no ar no meio de cultivo).

De acordo com o esquema representado na Figura 14, o reator (cujo volume total é de 30 litros) encontra-se no interior de um recipiente maior, onde 18 litros de cultivo são bombeados para dentro do mesmo e retornam ao recipiente, causando a turbulência na queda.

### 4.3 Teste de extração de Lipídios da *Chlorella vulgaris*

De acordo com os resultados obtidos por Zorn (2017), a umidade da biomassa pode influenciar na extração de lipídios. Sendo assim, buscando uma melhor condição nesta etapa, algumas condições de extração foram testadas, a partir da microalga cultivada em meio BBM padrão, em recipientes transparentes de 2 L, sendo a biomassa coletada e testada.

Foram realizados testes com biomassa seca, os quais apresentaram resultados insatisfatórios, com porcentagem de extração de lipídios em torno de 5 à 6 %. Tendo isto em vista, foram realizados testes de extração de lipídeos a partir da biomassa com 64 e 84 % de umidade, conforme a metodologia seguida por Zorn (2017).

Em 1 g de biomassa seca, adicionou-se água para obter-se a umidade desejada (64, e 84% de umidade), sendo a mistura mantida no ultrassom por 15 min. Em seguida, adicionou-se a solução de clorofórmio e metanol (9,4 mL:10,2 mL) de, a cada grama de biomassa; a mistura foi mantida no ultrassom por 35 minutos. Em seguida adicionou-se 9,4 mL de clorofórmio por grama de biomassa onde, uma vez transcorridos 35 min em ultrassom, adicionou-se água (3,4 mL por grama de biomassa). Em seguida, procedeu-se com a centrifugação, para a separação das fases. O teste foi repetido 3 vezes com a mesma biomassa (em duplicata) para avaliar a remoção total dos lipídios da biomassa.

### 4.4. Preparo da biomassa Extraída

Para produzir a biomassa seca a ser adicionada ao cultivo, a microalga foi cultivada em reatores de colunas e bolhas com capacidade de 44 L (Figura 15): a biomassa produzida foi então extraída após 12 dias de cultivo, sendo então hidratada, de modo a alcançar a condição de 64% de umidade (que resultou nos maiores rendimentos de extração). Em seguida procedeu-se com a extração dos lipídios, sendo a biomassa remanescente conservada para retornar ao reator, sendo esta uma condição não testada e sem dados na literatura. Como a *Chlorella vulgaris* tem a capacidade de crescer em condições mixotrófica e heterotrófica o retorno dessa biomassa extraída visa avaliar se está é consumida como fonte de carbono pela microalga ajudando no seu crescimento.

**Figura 15 - Reator de colunas com *Chlorella vulgaris***



**Fonte: o autor.**

#### **4.5 Teste utilizando a Matriz L8 de Taguchi**

Foi utilizada uma matriz de Taguchi L<sub>8</sub> (Tabelas 6 e 7) para avaliar os efeitos dos fatores nutricionais (% de Nitrato, % de Fosfato Dipotássico e Monopotássico, traços de glicerol) no meio de cultivo, além do retorno de biomassa após extração de lipídios e do tempo de luminosidade, sendo as variáveis resposta: (i) rendimento de óleo e (ii) rendimento da biomassa. Para todos os experimentos foram utilizados meio BBM modificando apenas os fatores citados acima.

Os fatores nutricionais avaliados no presente trabalho são de grande importância no cultivo das microalgas. Visto que, segundo dados da literatura, o nitrato em baixas concentrações pode gerar o acúmulo de lipídios, no presente trabalho foram realizados testes com 50 e 150% da quantidade do meio BBM padrão, de modo a avaliar a influência deste nutriente.

Na constituição do meio BBM utiliza-se duas fontes de fosforo para suplementar o meio, a fonte K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, apresenta dois K, ao ionizar ficaria 2K<sup>+</sup>

deixando o meio básico, já o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ao ionizar ficaria como  $2\text{H}^+$ , deixando meio ácido, portanto acredita-se que a utilização de duas fontes de fósforo no meio se dá para que se possa ter um melhor controle do pH do meio de cultivo. Sendo assim, no presente trabalho foi avaliada a influência da utilização das duas fontes de fósforo em relação ao crescimento de biomassa microalgal e produtividade de lipídeos.

Visto que o glicerol atua como fonte de carbono para as microalgas quando em condições mixotrófica ou heterotrófica, aliado ao fato do mesmo ser um resíduo da transesterificação dos lipídios em biodiesel, na tentativa de reduzir o custo referente ao cultivo das microalgas, no presente trabalho avaliou a influência do glicerol no meio de cultivo.

Na tabela 5, encontra-se o fator D; neste projeto optou-se por não adicionar uma variável neste fator deixando assim então a coluna D vazia, pois está seria usada como grau de liberdade para o cálculo da ANOVA, sendo melhor explicado nos resultados.

**Tabela 5 - Parâmetros de controle e níveis utilizados para seleção das variáveis significativas no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.**

Fator	Variável	Nível Baixo (1)	Nível Alto (2)
A	Nitrato 150 g/L (mL/L)	2,5	7,5
B	Biomassa seca (g)	0,0	5,0
C	Glicerol (g/L)	0,0	2,0
D	Vazio	-	-
E	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (mL/L)	5,0	15,0
F	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (mL/L)	5,0	15,0
G	Fotoperíodo (h)	0,0	12,0

Fonte: autor

**Tabela 6 - Matriz experimental segundo planejamento de Taguchi L8.**

Experimento	Nitrato(A)	Biomassa Extraída(B)	Glicerol(C)	Vazio	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (E)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (F)	Fotoperíodo(G)
1	1	1	1	-	1	1	1
2	1	1	1	-	2	2	2
3	1	2	2	-	1	2	2
4	1	2	2	-	2	1	1
5	2	1	2	-	2	1	2
6	2	1	2	-	1	2	1
7	2	2	1	-	2	2	1
8	2	2	1	-	1	1	2

Fonte: autor

Cada teste foi realizado em triplicata em recipientes de 6 litros no qual, sendo adicionados 4,5 L de meio nas devidas condições, sendo os mesmos, antes de cada teste, sanitizado com hipoclorito (Lourenço, 2006). Após a sanitização foi adicionado o inóculo, de forma que todos experimentos iniciassem com uma concentração de células uniforme finalizando com um volume final de aproximadamente 5,2 L. Uma vez realizado o inóculo, foi feito um acompanhamento do cultivo por 8 dias. Findo este período, a biomassa foi floculada (Sulfato de Alumínio), filtrada e seca na estufa. Para o processo de extração dos lipídios a biomassa seca foi reconstituída com água, de modo a obter 64% de umidade conforme método exemplificado no tópico 4.3.

A Figura 16 apresenta o cultivo dos inóculos no escuro; para o cultivo no claro, a disposição é similar, mas com os recipientes expostos à luz.

**Figura 16 - Experimento no escuro**



Fonte: autor

## **4.6 Concentração de Biomassa**

Para determinar a concentração de biomassa de cada experimento foi utilizada a técnica de gravimetria, sendo então utilizado um frasco de vidro previamente tarado, no qual foi adicionado a biomassa úmida, que após ser seca na estufa foi pesado novamente determinando assim a concentração de biomassa de cada experimento.

Para acompanhamento do crescimento celular foi utilizado um espectrofotômetro, no qual mediu-se a absorbância do meio a 680 nm, em intervalos regulares de 24 horas, o que permitiu a construção de uma curva de calibração linearizada.

## **4.7 Teste Utilizando Efluente da Estação de Tratamento da EEL**

### **4.7.1 Teste de viabilidade**

Primeiramente, foram realizados testes experimentais utilizando recipientes de 2L para verificar a viabilidade da utilização do efluente como meio de cultivo, após este teste foi identificado um alto crescimento da *Chlorella vulgaris* ao utilizar efluente da estação de tratamento da EEL como meio. Foi então realizado um cultivo em recipientes de 5L para determinar o crescimento de biomassa e a quantidade de lipídios.

### **4.7.1 Reator de coluna em PVC sem iluminação**

De acordo com testes preliminares, foi identificado uma alta capacidade de crescimento da *Chlorella vulgaris* em condição heterotrófica, ao utilizar o efluente com adição periódicas de glicerol. Diante disso, foi construído um reator de colunas de 4 litros utilizando PVC, representado na Figura 17.

**Figura 17 - Reator de colunas em PVC**



**Fonte: o autor.**

O reator ilustrado na Figura 17 foi utilizado para o cultivo da *Chlorella vulgaris* em um meio composto por 25% do inóculo concentrado e 75% de efluente proveniente da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da Escola de Engenharia de Lorena. Foi adicionado glicerol (2g/L) a cada 4 ou 5 dias, de acordo com a leitura da absorbância a 680 nm.

#### **4.8 Análise de perfil de ácidos graxos.**

As análises do perfil composicional de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, CEMPEQC, Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Petróleo e Derivados.

Foi utilizada a técnica de cromatografia gasosas seguindo a metodologia ET ISO 12966-2 (2012)

#### 4.9 Cálculo da produtividade de Lipídeos.

A produtividade de lipídios foi calculada da seguinte forma:

$$P = \frac{M}{V \cdot D}$$

Onde:

P = Produtividade de Lipídios ( g/L.dia)

M = Biomassa seca coletada do reator(g)

V = Volume (L)

D = Tempo(dias)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de extração de Lipídios da *Chlorella vulgaris*:

Conforme citado anteriormente pegou-se biomassa seca de um cultivo BBM padrão, secou-se e então extraiu-se a mesma biomassa por três vezes em duplicata. Os resultados das extrações estão representados na Tabelas 7.

Tabela 7 - Teste de Extração de Lipídios

	1 Extração			2 Extração			3 Extração			Somatória		
	Seca	64%	84%	Seca	64%	84%	Seca	64%	84%	Seca	64%	84%
<b>Amostra 1</b>	5,50	12,80	11,50	0,00	1,80	2,90	0,00	0,00	0,00	5,50	14,60	14,40
<b>Amostra 2</b>	6,50	12,90	11,20	0,00	2,70	3,50	0,00	0,00	0,00	6,50	15,60	14,70
<b>Média</b>	6,00	12,85	11,35	0,00	2,25	3,20	0,00	0,00	0,00	6,00	15,10	14,55

Fonte: o autor.

Conforme consta na tabela anterior, na terceira extração não foi identificado a presença de óleo em nenhuma condição, mostrando que todo óleo foi removido após 2 repetições.

Ao calcular o desvio padrão entre as medias das extrações de 64% e 84% verificou-se um desvio de 0,39 sendo um valor muito baixo, portanto a diferença entre as duas condições é irrelevante. Porém houve um melhor rendimento ao utilizar 64% de umidade, portanto todos os próximos teste foram fixados nesta umidade estabelecendo assim um padrão para todas extrações.

Para os seguintes testes foi realizada apenas uma extração, pois a quantidade extraída na segunda extração é muito baixa e, de acordo com os resultados dos outros testes verificou-se que este não é o fator limitante, mas sim a condição na qual a biomassa foi cultivada, permitindo alta concentrações de lipídeos com apenas uma extração como será demonstrada neste trabalho.

### 5.2 Fotobioreator com bomba de refluxo

Este reator passou por construção durante 4 meses, quando então foram realizados os testes para verificar a sua viabilidade operacional sendo representado na Figura 18.

Foram realizados sete testes neste reator: cinco deles com *Chlorella vulgaris* e dois com *Chlorella minutíssima* em meio BBM padrão e meio meio guillard f/2. (Lorenço, 2006)

Dos testes realizados com *Chlorella vulgaris*, o sistema de agitação utilizado em dois deles foi apenas por meio de uma bomba submersa Sarlo Better (1000a-110V, bomba de aquário), enquanto que nos outros três, além desta bomba, utilizou-se um compressor de ar no interior do recipiente maior.

**Figura 18 - Fotobioreator com bomba de refluxo**



**Fonte: autor**

Em nenhum dos testes realizados verificou-se crescimento celular: no terceiro dia de cultivo verificou-se a decantação das células e, no quarto dia, houve uma mudança na cor do cultivo de verde para amarelo e, ao realizar a contagem celular, verificou-se que praticamente não existiam mais células no reator.

Com a *Chlorella minutíssima* (o teste com essa espécie foi apenas realizado para verificar se o problema com o crescimento com a *Chlorella vulgaris* neste reator era devido a espécie ou a outro fator, portanto essa espécie não está no foco deste trabalho) foram realizados dois testes: um deles sendo agitado apenas com a bomba submersa e, no segundo, além da bomba foi utilizado o compressor no recipiente externo. Assim como a *Chlorella vulgaris*, não houve crescimento; porém,

nessa espécie, verificou-se a mudança de cor e a decantação ocorreram no quinto dia.

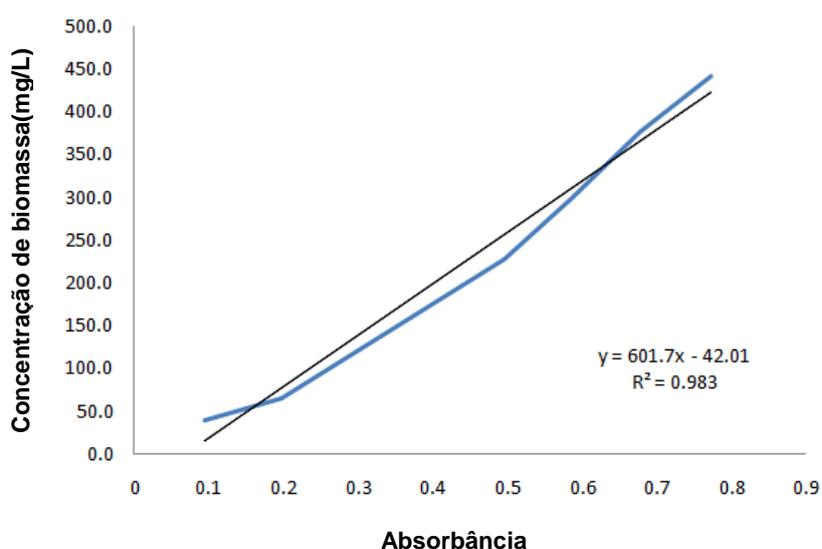
Buscando entender a ineficiência deste reator retirou-se a bomba do mesmo e foram feitos dois testes com *Chlorella vulgaris*, em um recipiente de 10 L, utilizando somente a bomba como agitador e, assim como no reator, não houve crescimento celular. Portanto, acredita-se que este modelo de bomba submersa não seja adequado para cultivo de microalgas o que torna este modelo de reator inviável.

### 5.3 Matriz experimental de Taguchi

Para acompanhamento diário do perfil de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, para cada experimento, foi construída uma curva de calibração no espectrofotômetro. Nesta curva pode-se acompanhar o crescimento diário da microalga, através da absorbância, sendo possível determinar a concentração de biomassa em cada estágio dos experimentos.

A curva está representada na Figura 19 para concentração de biomassa sendo que esta foi calibrada com cultivo em BBM padrão.

Figura 19 – Curva de calibração para concentração de biomassa



Fonte: o autor.

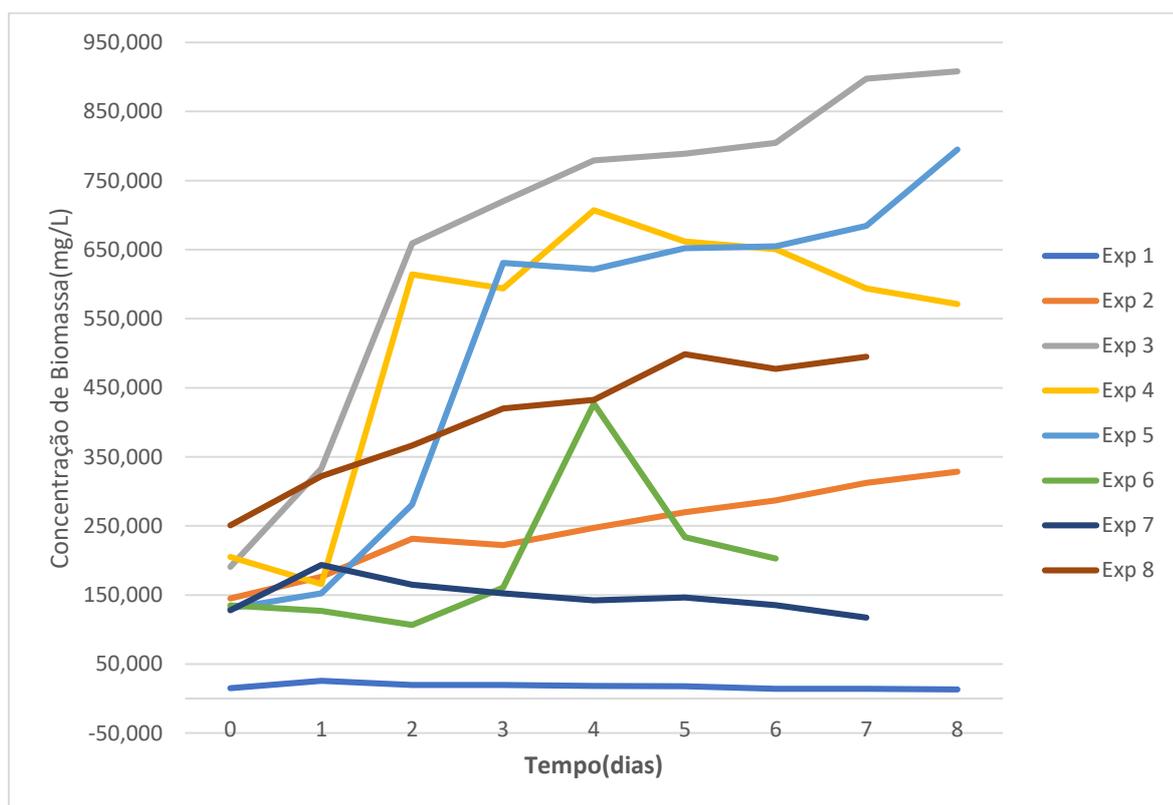
Os resultados dos experimentos da matriz de Taguchi (Tabela 6) estão na Tabela 8 e o perfil de crescimento está representado no Figura 20.

**Tabela 8 - Resultados de Biomassa e Lipídios para cada condição experimental.**

Experimento	Rendimento de Biomassa (g/L)	% de Lipídeos	Produtividade de Lipídios (mg/L.dia)
1	0,000	0,00	0,00
2	0,234	18,25	5,35
3	1,800	4,25	9,56
4	1,538	21,60	41,54
5	1,029	6,85	8,79
6	0.746	23,00	28,62
7	1,122	0,89	1,66
8	1,451	32,32	66,98

Fonte: o autor.

**Figura 20 - Perfil de crescimento dos Experimentos**



Fonte: o autor.

Ao analisar a condição experimental número 7, identificou-se que a biomassa extraída não é consumida, visto que a biomassa obtida após secagem é idêntica à adicionada ao meio de cultivo e não apresenta lipídeos, que já havia sido

extraído anteriormente. Nos experimentos 3, 4 e 8, onde a biomassa extraída também foi utilizada no cultivo, obteve-se crescimento celular, provavelmente devido a outras fontes (luz e glicerol), visto também que a biomassa inicialmente adicionada continuou presente, no momento da coleta. Sendo assim, para melhor avaliar o crescimento da biomassa dentro de Taguchi o peso desta biomassa seca adicionada foi descontado tendo assim um resultado mais apurado.

Para analisar os resultados da matriz de Taguchi foi utilizado o software Minitab18. Os dados utilizados para os cálculos são os dados representados na Tabela 9.

**Tabela 9 – Respostas de crescimento de Biomassa com Desvio Padrão e Erro**

Exp	Resposta1 (mg/L)	Reposta2 (mg/L)	Resposta3 (mg/L)	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Erro %
1	34,41	37,26	36,69	1,51	0,87	36,12	2,41
2	297,95	350,89	331,53	26,78	15,46	326,79	4,73
3	735,53	853,93	765,13	61,61	35,57	784,86	4,53
4	479,96	464,02	454,92	12,68	7,32	466,30	1,57
5	796,00	848,37	659,39	97,57	56,33	767,92	7,34
6	428,87	408,95	422,04	10,12	5,84	419,95	1,39
7	39,97	51,35	19,48	16,15	9,33	36,93	25,25
8	324,57	421,33	436,13	60,59	34,98	394,01	8,88

Fonte: o autor.

Como se pode verificar, o maior erro apresentado foi na condição 7, isso se dá pois nessa condição não houve crescimento, já que a microalga não respondeu à proposta de consumir a biomassa extraída como fonte de energia. Já as condições experimentais 5 e 8 apresentaram, respectivamente, erro de 7,34% e 8,88%, este erro é aceitável devido à variação de temperatura (os reatores não tem controlador de temperatura havendo, portanto, uma variação entre eles), variação na agitação por bolhas (compressor não gera bolhas iguais, mantendo apenas a vazão) e intempéries do ambiente os quais não são possíveis controlar e que influenciam muito no crescimento das microalgas, sendo assim essa variação considerada baixa.

Ao realizar uma análise preliminar no *software* identificou-se um valor muito baixo do fator B (biomassa seca): sendo assim, este fator foi desconsiderado na análise e utilizado para calcular o erro como grau de liberdade.

Para determinação dos coeficientes, tendo o crescimento de biomassa como resposta, tem-se a ANOVA para o modelo estimado por Razões S/N “maior é melhor”, especificado na Tabela 10 e o gráfico de efeitos dos parâmetros estudadas na Figura 21.

**Tabela 10 - Anova do crescimento de Biomassa para modelo Razões S/N maior é melhor**

Fonte	GL	SQF	SMQF	F	P
A	1	18,230	18,229	24,700	0,126
C	1	581,160	581,158	787,420	0,023
D	1	236,670	236,674	320,670	0,036
E	1	1,420	1,424	1,930	0,397
F	1	6,900	6,898	9,350	0,201
G	1	320,290	320,294	433,970	0,031
Erro de Resíduos	1	0,740	0,738		
Total	7	1165,410			

Fonte: o autor.

Onde:

SQF: Soma Quadrática dos Fatores

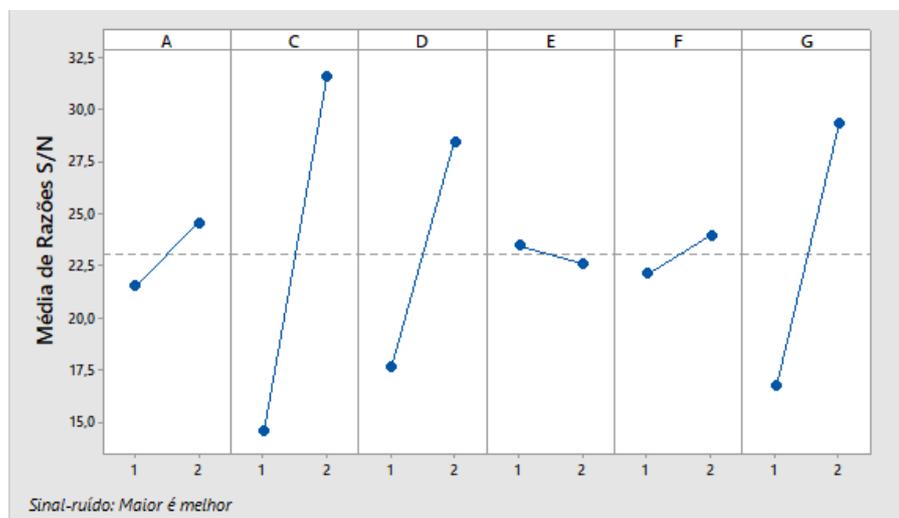
GL: Graus de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância.

**Figura 21 - Gráfico dos efeitos para do crescimento de Biomassa para modelo Razões S/N maior é melhor**



A:Nitrato; C:Glicerol; D:Coluna vazia; E: Fostato Dipotássico; F: Fostato Monopotássico; G:Fotoperíodo

Fonte: o autor.

Como se pode verificar na ANOVA e no Gráfico de efeitos representados na Tabela 10 e Figura 21, o fator mais relevante para crescimento desta microalga foi o fator C (glicerol), seguido pelo fator G (fotoperíodo), o fator D demonstrou-se relevante, porém este fator é uma coluna vazia na matriz experimental (no caso ele representa uma interação entre os fatores A e E). Do ponto de vista estatístico os fatores C, G e D foram os mais relevantes na matriz experimental, apesar do fator A (nitrato) também apresentar relevância no processo, ainda que em menor magnitude. Já os fatores E e F não apresentaram relevância para o processo de crescimento de biomassa, portanto a melhor condição para o processo está representada na Tabela 11.

**Tabela 11 - Melhor condição para crescimento de biomassa para modelo Razões S/N maior é melhor**

	A Nitrato	B Biomassa Extraída	C Glicerol	D vazio	E Fosfato Dipotássico	F Fosfato Monopotássico	G Fotoperíodo
Melhor Condição	2	1	2	-	1 ou 2	1 ou 2	2
Exp 5	2	1	2	-	2	1	2

**Fonte: o autor**

Como pode ser verificado na Tabela 11, a melhor condição de cultivo testada para acúmulo de biomassa foi a condição 5. Ao analisar a Figura 20 percebe-se que a condição 3 (de acordo com a Tabela 5) apresenta um crescimento maior, porém isso se dá ao fato de ter biomassa extraída no meio que se descontada teremos a condição 5 como melhor condição.

No trabalho de Loures (2016) os experimentos foram realizados de acordo com uma matriz experimental de Taguchi L9 e determinou-se que crescimento celular e a produtividade de lipídeos dependeu da concentração inicial de nitrato, do fluxo de dióxido de carbono, da concentração de fosfato, da suplementação e da temperatura onde foi obtido uma concentração de biomassa de 0,245g/L com 37,08% de lipídios para *Chorella minustissima*. A espécie microalgal e as condições de cultivo autotrófico/mixotrófico podem justificar tal diferença.

Ao analisar a produtividade de lipídios pelo método de Taguchi não se obteve representatividade estatística, portanto esses dados não foram utilizados para determinar a melhor condição para produtividade de lipídios. De acordo com

a Tabela 11, a melhor condição encontrada para produtividade de lipídios foi a do experimento 8.

#### 5.4 Teste da viabilidade do uso do Efluente da Estação de tratamento da EEL

Após identificar o crescimento da *Chlorella vulgaris* no efluente da EEL foi realizado um teste em recipientes de 5 litros no qual obteve-se os dados representados na Tabela 12.

**Tabela 12 - Comparativo dos meios de cultivo BBM e Efluente.**

Meio	Rendimento de Biomassa (g/L)	Lipídios (%)	Produtividade de Lipídios(mg/L.dia)
BBM	0,98	15,1	14,8
Efluente	1,90	16,5	26,1

Fonte: o autor

Visto que os resultados da Tabela 12 são promissores, Blanco (2017) seguiu o mesmo procedimento de cultivo, com a *Chlorella vulgaris*, no qual pôde-se identificar uma queda na quantidade de matéria orgânica e redução da concentração de nitrato como pode ser visualizado na Tabela 13.

**Tabela 13 - Comparativo de BBM e Efluente para remoção de matéria orgânica.**

Parâmetros	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	BBM
Produtividade de Biomassa (mg. L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	1.60	4.00	2.30	2.2
Produtividade de Lipídios (mg. L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	2.46.10 <sup>-4</sup>	5.29.10 <sup>-4</sup>	5.26.10 <sup>-4</sup>	3,75. 10 <sup>-4</sup>
Remoção de Nitrato (%)	54.00	78.74	74.57	75.22
Remoção de DQO (%)	17.73	36.13	26.92	0.0

Fonte: Blanco (2017).

Considerando que o PVC é um material de menor custo, aliado ao fato do crescimento no escuro eliminar a utilização de luzes fluorescentes, buscando reduzir os custos com o reator e custos operacionais, foi então construído um reator tubular

de PVC para avaliar o crescimento da *Chlorella vulgaris* utilizando efluente e glicerol.

#### 5.4.1 Reator tubular em PVC

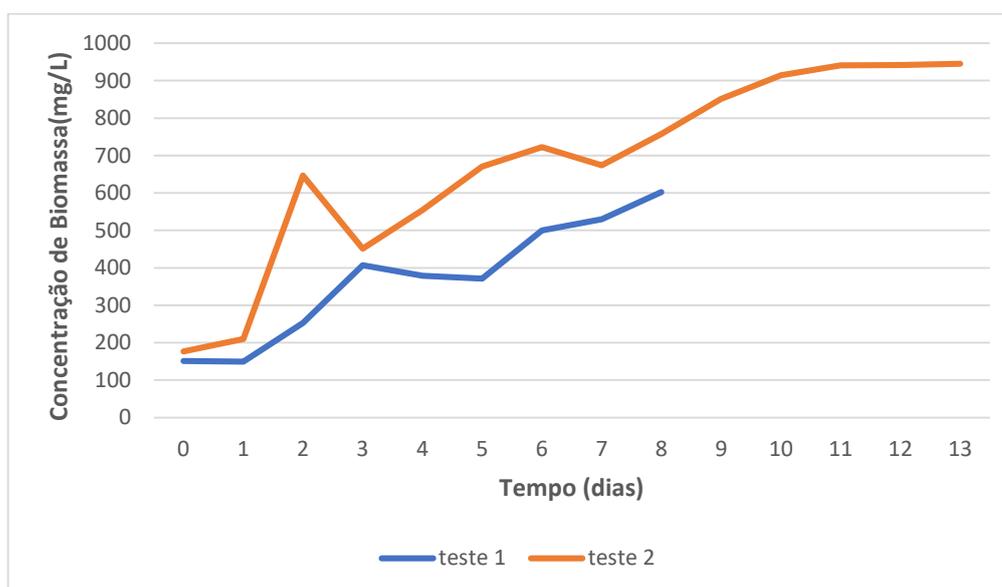
Foram realizados dois testes no reator em PVC, onde os resultados estão representados na Tabela 14 e o perfil de crescimento microalgal na Figura 22.

**Tabela 14 - Produtividade de lipídios no reator de colunas em PVC.**

Exp	Rendimento de Biomassa (g/L)	Lipídios (%)	dias	Produtividade de Lipídios(mg/L.dia)
teste 1	0,975	44,50	8	54,23
teste 2	2,580	42,00	13	83,35

Fonte: o autor

**Figura 22 - Perfil de crescimento de biomassa no reator de colunas em PVC.**



Fonte: o autor

Como pode ser verificado na Figura 22, a adição de glicerol com intervalos de aproximadamente 4 dias é essencial para o crescimento do cultivo. Isso demonstra que a utilização de um reator tubular utilizando PVC para cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando efluente e adição de glicerol, aumenta a concentração de biomassa

do cultivo, assim como a porcentagem de lipídios e, conseqüentemente, uma produtividade maior em lipídeos com menores custos de construção e de operação, quando comparado ao dos reatores em condições autotróficas.

Em outros estudos ao cultivar, as *microalgas Chlorella sp, Micractinium, e Actinastrum* em efluentes, obteve-se uma produtividade de lipídeos entre 9,7 mg/L.d a 24 mg/L.d (WOERTZ et al., 2009). Já Katiyar et al. (2017), utilizando glicerol bruto (28%) para cultivar *Chlorella sp* em condições heterotróficas obtiveram uma produtividade de biomassa de 446 mg/L.dia e produtividade de lipídios de 165mg/L.dia, resultando em uma porcentagem de 36% de lipídios.

Segundo Mata et al. (2010), a produção de óleo de soja é de 1,74 L.ha<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, com a microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em reator de PVC no escuro (dados do teste 2) em uma mesma área a produtividade de óleo seria de aproximadamente 237.ha<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, tendo uma produtividade de 137 vezes mais óleo q a soja no ano. Está produção pode ainda ser maior se os reatores utilizados forem maiores que 4 litros, sendo assim então isso demonstra que esses tipos de cultivos devem ser melhores estudados pois apresentam um grande potencial para produção em larga escala.

#### 5.4 Perfil de ácidos graxos

Os resultados da análise de insaturações e o perfil de ácidos graxos estão representados na Tabela 15 e 16 respectivamente.

**Tabela 15 – Perfil de ácidos graxos segundo insaturações.**

	PVC Teste 1(%) Exp 5(%)	
<b>FAME Saturados:</b>	45,42	40,29
<b>FAME Monoinsaturados:</b>	36,22	21,92
<b>FAME Polinsaturados:</b>	18,36	37,80

Fonte: o autor

Tabela 16 – Perfil de ácidos graxos.

	PVC teste 1(%)	EXP 5(%)
<b>C4:0</b>	2,51	7,56
<b>C12:0</b>	1,41	3,34
<b>C14:0</b>	2,36	0,71
<b>C15:0</b>	0,65	0,00
<b>C16:0</b>	34,55	26,75
<b>C16:1</b>	15,90	4,80
<b>C17:0</b>	1,33	0,00
<b>C18:0</b>	1,77	1,04
<b>C18:1n9C</b>	20,32	17,12
<b>C18:2n6C</b>	6,96	13,06
<b>C20:0</b>	0,00	0,25
<b>C18:3n6</b>	2,00	4,88
<b>C18:3n3</b>	7,20	17,80
<b>C20:2n6</b>	1,46	2,06
<b>C22:0</b>	0,00	0,23
<b>C20:3n6</b>	0,41	0,00
<b>C23:0</b>	0,83	0,41
<b>C22:2n6</b>	0,34	0,00

Fonte: o autor

A partir dos dados da Tabela 16, foi então utilizado o *software* Biodiesel Analyzer, o que permitiu a obtenção da qualidade aproximada de tais ácidos graxos sendo apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Propriedades do biodiesel segundo biodiesel analyzer

Propriedades	PVC teste 1	Exp 5	Especificação (ANP 2014)
<b>CN</b>	61,73	51,28	>50
<b>IV</b>	68,45	97,23	max 120
<b>PEFF</b>	-5,8	-8,31	<5°C
<b>EO</b>	10,45	6,06	min 8 horas

Fonte: o autor

Sendo assim, pode-se verificar a viabilidade em se utilizar esses ácidos graxos para produção de biodiesel, visto que os mesmos estão dentro das especificações importantes segundo ANP 2014.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados expressos no item anterior, quanto á Matriz Experimental de Taguchi, pode-se concluir que

- A utilização de biomassa extraída no meio, visando o seu consumo como matéria orgânica para microalgas, provou-se nula;
- Os fatores mais importantes para o cultivo de *Chlorella vulgaris* foram glicerol e fotoperíodo luminoso, visando uma maior concentração de biomassa no cultivo;
- O nitrato mostrou uma influência de menor magnitude, porém relevante, visando uma maior concentração de biomassa no cultivo;
- A melhor condição encontrada para produção de biomassa foi a condição experimental 5;
- A melhor condição encontrada para produtividade de lipídios foi a de número 8.

Quanto à viabilidade da utilização do efluente como meio de cultivo, é possível concluir que:

- Efluente demonstrou-se capaz de concentração biomassa e aumentar a produtividade de lipídios em relação ao meio BBM padrão;
- Nos testes realizados no reator de PVC no escuro obteve-se um alto rendimento de biomassa e uma alta produtividade de lipídios, provando assim a viabilidade da utilização deste para produção de microalgas em larga escala;

## **7 PRÓXIMAS ETAPAS**

Para trabalhos futuros fica proposto a criação de um reator contínuo de PVC no escuro e utilizar um planejamento de experimentos utilizando para determinar a razão ideal de alimentação de efluente/glicerol buscando melhorar ainda mais a produtividade e produção em maior escala dessa biomassa.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL, S.; DURAIARASAN, S.; SHELLOMITH, A. S. S. Statistical optimization of harvesting *Chlorella vulgaris* using a novel. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 150–156, 2015.
- ANTONIO, P.R. **Avaliação do efeito do CO<sub>2</sub> na produção lipídica de *Chlorella vulgaris* visando à produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 544 p.
- BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.
- BAIEE, M. A. Effect of phosphorus concentration and light intensity on protein content of microalga *Chlorella vulgaris*. **Mesopotamia Environmental Journal**, v. 2, n. 2, p. 75–86, 2016.
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 41, 1489- 1500, 2015.
- BEN. Balanço Energético Nacional, Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2004.
- BLANCO, G.C. **Teste da viabilidade da utilização do efluente da Escola de Engenharia de Lorena para cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em reator batelada visando o acúmulo de lipídeos e o tratamento da água**. 2017, p.49. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification, **Canadian Journal of Biochem. Physiol.**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOLBOACĂ, S. D.; JÄNTSCHI, L.; Design of experiments: useful orthogonal arrays for number of experiments from 4 to 16. **Entropy**, v.9, p.198-232, 2007.
- CAVALCANTE, A.N.; CHAVES, M.H.; ARAÚJO, C.M. Obtenção e caracterização de biodiesel do óleo degomado e in natura de *Orbignya speciosa*. In: ANAIS DO SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOCMBUSTÍVEIS. Teresina, 27-29 de abril de 2016.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation – sedimentation. **ALGAL**, v. 13, p. 271–283, 2016.

CHIU, S. et al. Bioresource technology cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179–189, 2015.

CHU, W. L. Biotechnological applications of microalgae. **leJSME**, v. 6, n. 1, p. S24–S37, 2012.

CONCEIÇÃO, L. R. V.; ALMEIDA, R. C. S.; PANTOJA, S. S.; SILVA, M. M. C.; COSTA, C. E. F.; ROCHA FILHO, G. N.; ZAMIAN, J. R. Caracterização Físico-Química e Térmica do Biodiesel Etilico de Bacaba (*Oenocarpus bacaba*, Mart.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 48,2008, Rio de Janeiro, outubro de 2008.

DANTAS, M.B. **Obtenção, caracterização e estudo termoanalítico de biodiesel de milho**. 2006. 205 f. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

DELIA, B.; GRIGORE, V.; MIRCEA, B. The taguchi method and conditions for its implementation in high performance athletic training. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 117, p. 378–382, 2014.

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

EVANS, L. et al. Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 24, n. May, p. 368–377, 2017.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 101–105, 2011.

FERNÁNDEZ-LINARES, L. C. et al. Bioresource Technology Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. **Bioresource Technology**, v. 244, n. July, p. 400–406, 2017.

GARCIA, C. M.; **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 310p. Dissertação (Mestre em Química) - Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L., CHANLEY, MH. (Eds.). **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Plenum, 1975

GODOS, I.; VARGAS, V.A.; BLANCO, S.; GONZÁLES, M.C.G.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; BECARES, E.; MUNHOZ, R. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggy wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresource Technology**, v.101, n 14, 5150 - 5158, 2010.

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

HALLMANN, A. Algae Biotechnology - green cell-factories on the rise. **Current Biotechnology**, n.4, p.389-415, 2015.

HE, Y.; WANG, Y.; SONG, X. High-effective denitrification of low C/N wastewater by combined constructed wetland and biofilm-electrode reactor (CW–BER). **Bioresource Technology**, n. 203, p. 245-251, 2016.

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

HUANG, J.J.; BUNJAMIN, G.; TEO, E.S.; LEE, Y.K. An enclosed rotating floating photobioreactor (RFP) powered by flowing water for mass cultivation of photosynthetic microalgae, **Biotechnology for Biofuels**, v.9, p. 218, 2016.

HUANG, M.; HUNG, Y.; YANG, Z. Validation of a method using Taguchi , response surface , neural network , and genetic algorithm. **Measurement**, v. 94, p. 284–294, 2010.

ISO 12996\_2012 \_ Analise composicional de oleos vegetais - BF3.pdf

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae : Review on microalgae s cultivation , harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, n. October 2015, p. 692–709, 2017.

JIANG, Y.; KALODIMOS, C. G. N. M. R.; Studies of large proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 17, p. 2667–2676, 2017.

JOSE, H. et al. World Largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Robust Design and Taguchi Method Application. [s.d.].

KATIAR, R. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 113, p. 1359-1365, 2017.

KEE, M. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. **Renewable Energy**, v. 103, p. 197–207, 2017.

KLEIN, BC. **Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química , Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

KIM, J.B.P.; LINGARAJU, R.; RHEAUME, R.; LEE, J.Y.; SIDDIQUI, K.F. Removal of ammonia from wastewater effluents by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v.15, n.4, p. 391-396, 2010.

DONG, TAO.; LAURENS, L. M. L.; Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 177, n. June, p. 879–895, 2016.

KONG, Q.X.; LI, L.; MARTINEZ, B.; CHEN, P.; RUAN, R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.1,p 9-18, 2010.

LAM, G. P. et al. Pulsed electric field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*. **Algal Research**, v. 24, p. 181–187, 2017.

LAMA, S. et al. Bioresource technology flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 464–470, 2016.

LEITE, R.C.C; LEAL, M.R.L.V. O Biocombustível no Brasil. **Novos Estudos – CEBRAP** n.78, p.15-21, 2007.

LEONI, R. et al. - APPLICATIONS Edited by Messias Borges Silva. [s.l: s.n.].

LI, T. et al. Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. **ALGAL**, v. 16, p. 481–491, 2016.

LIAO, Q. et al. Bioresource Technology Simultaneous enhancement of *Chlorella vulgaris* growth and lipid accumulation through the synergy effect between light and nitrate in a planar waveguide flat-plate photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 528–538, 2017.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**. 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**. ano. 2016, p.154 Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Guaratinguetá, 2016.

LÚCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. 2014. 71 p. Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid - An efficient biodiesel yield and its characterization. **Renewable Energy**, n.81, p. 523–533, 2015.

MIAO, M. et al. International biodeterioration & biodegradation Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 120–125, 2016.

MUJTABA, G.; LEE, K. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. **Water Research**, v. 120, p. 174–184, 2017.

NECKEL, A.; GOELLNER, E; BERTOLDI, T. The efficiency in the treatment of effluent bullets industry with sludge modification in anaerobic. **Reget**, v.20, n.1, p.427-437, 2016.

NEOFOTIS, P; HUANG, A; SURY, K; CHANG,W; JOSEPH,F; GABR,A; TWARY, S; QIU, W; HOLGUIN,O; POLLE, J. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal research**, n.15, p.164-178, 2016.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry** v.31, n.2, p 135-152, 2000.

PAWLOWSKI, A. et al. Control engineering practice selective pH and dissolved oxygen control strategy for a raceway reactor within an event-based approach. **Control Engineering Practice**, v. 44, p. 209–218, 2015.

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.24, p.159–171, 2013.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; PINO, F. B. D.; MESKO, F. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v.35 n.10, p. 2013-2018, 2012.

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

POHNDORF, R. S.; CAMARA, A.S.; LARROSA, A. P. Q.; PINHEIRO, C. P.; STRIEDER, M. M.; PINTO, L. A. A. Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and Bioenergy**, n. 93, p.25-32, 2016.

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**, n.153, p. 799-809, 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007. 906p.

SAFIA, C.; ZEBIBA, B.; MERAHA, O.; PONTALIERA, P. Y.; VACA-GARCIAA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SCHMITZ,R; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M.; Environmental applications of microalgae. **Revista Ciatic**, v.4, n.1, p. 48-60, 2012.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. **Fuel**, v.87, n.12, p.2355-2373, 2008.

SHEN, X. et al. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. **ALGAL**, v. 17, p. 261–267, 2016.

SERRA, T.M. **Desenvolvimento de catalisadores a base de estanho(IV), para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos, via transesterificação E Esterificação**. 2010, 89 f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Engenharia química) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2010.

SILVEIRA; M. A.(Coord.). Batata-doce: uma nova alternativa para a produção de etanol. In: INSTITUTO EUVALDO LODIL NÚCLEO CENTRAL. Alcool Combustível. Brasília: INL/NC, 2008. p109-122(série industrial em perspectiva).

SU, Y. et al. Progress of microalgae biofuel ' s commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. December 2016, p. 402–411, 2017.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Usina Virtual. Disponível em: <http://www.unica.com.br/usina-virtual>.

URSU, A. et al. Bioresource technology extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.

TANGO, M. D.; **Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas**. ano. 2015, p.95. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

VINIEGRA-GONZALEZ, G., FAVELA-TORRES, E., AGUILAR, C. N., ROMERO-GOMEZ, S.D.J., DAZGODNEZ, G. e AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2, p. 157-167, 2003.

VIDOTTI, A.M.D.S. **Análise proteômica, crescimento e composição celular da microalga chlorella vulgaris sob autotrofia, mixotrofia e heterotrofia**. 2015, p.191 - Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

VOLZ, M.D.A. **Biodiesel a partir de óleos de alta acidez: desenvolvimento de um processo catalítico homogêneo**. 2009, p.78 - Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica Ambiental), Universidade Federal de Rio grande, 2009.

WANG, Y. et al. Bioresource Technology Cultivation of Chlorella vulgaris JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient / COD removal and carbohydrate production. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 619–625, 2015.

WOERTZ, I., FEFFER, A., LUNDQUIST, T., NELSON, Y.; Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **J. Environ. Eng.** n.135, p.1115–1122, 2009

XIE, T. et al. Bioresource technology nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga Chlorella vulgaris: Over-compensation strategy. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 247–255, 2017.

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

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

ZHAO, B.; ZHANG, Y.; CUI, G. Carbon dioxide fixation and biomass production from combustion flue gas using energy microalgae. **Energy**, n.89, p.347-357, 2015.

ZHU, L; HILTUNEN, E; SHU, Q. ZHOU, W; LI, Z; WANG, Z. Biodiesel production from algae cultivated in winter with artificial wastewater through pH regulation by acetic acid. **Applied Energy**, n.128, p.103-110, 2014.

ZORN, S. M. F. E. Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas. 2017. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.