

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

WALLYSON RIBEIRO DOS SANTOS

**Análise das variáveis de processo e de parâmetros reológicos da biomassa de
Chlorella minutíssima, cultivada em reator *Air-Lift*, para a produção de
biocombustíveis**

Lorena
2019

WALLYSON RIBEIRO DOS SANTOS

**Análise das variáveis de processo e de parâmetros reológicos da biomassa de
Chlorella minutíssima, cultivada em reator *Air-Lift*, para a produção de
biocombustíveis**

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 na área de Concentração de Desenvolvimento de Produtos e Processos

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Daniela Helena Pelegrine
Guimarães

Versão Corrigida

Lorena
2019

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)

Santos, Wallyson Ribeiro dos

Análise das variáveis de processo e de parâmetros reológicos da biomassa de *Chlorella minutissima*, cultivada em reator Air-Lift, para a produção de biocombustíveis / Wallyson Ribeiro dos Santos; orientadora Daniela Helena Pelegrine Guimarães - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
124 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.
2019

1. Reologia. 2. *Chlorella minutissima*. 3. Lixiviado. 4. Air lift. 5. Microalga. I. Título. II. Guimarães, Daniela Helena Pelegrine, orient.

*“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem,
você continuará vivendo, mas terá deixado de existir.”*
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar a capacidade de correr atrás dos meus sonhos e iluminar todos os caminhos que eu decido seguir.

Aos meus pais, Rita e Joaquim, e meu irmão William por sempre acreditarem que eu posso mais do que eu imagino e por nunca me deixarem desistir.

À Prof^ª. Dr^ª. Daniela Helena Pelegrine Guimarães, minha orientadora. Obrigado pela orientação, pela dedicação, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pelos ensinamentos, pelas conversas e por acreditar no meu trabalho, não apenas como pesquisador, mas também como educador.

Ao Prof. Dr. Gerônimo Virgínio Tagliaferro pelas inúmeras contribuições com esse projeto, pela paciência e por me incentivar a buscar resultados cada vez melhores.

Aos meus amados amigos Nathanne Rost, Cintia Maria Rodrigues Rosa, Caio Henrique Pinheiro, Ana Paula Teixeira e Valdimir Pereira por sempre me motivar a seguir em frente mesmo nos períodos em que pensei em desistir.

À minha segunda família Leandro Kellerman, Elyza Feltrin, Gabriel Nery, Vinícius Rodrigues e Marcos Alexandre, por transformar esses dois anos em Lorena nos mais agradáveis possíveis e me ensinarem que morar em república pode ser muito bom.

Aos meus queridos amigos de laboratório Guilherme Pedro, Alexandre Ricardi, Eduardo Bredda, Carolina Roma, Gilberto Ribeiro, Priscila Pereira e Mateus Amaral por todo o suporte que me forneceram, pela amizade e por transformar os dias mais estressantes em boas memórias.

À secretária da Pós-Graduação em Engenharia Química, Ana Beatriz, por todo o carinho, paciência, conversas, suporte e atenção nesses dois anos de estudo e trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e me possibilitar realizar esse projeto.

RESUMO

SANTOS, W. R. **Análise das variáveis de processo na composição celular e nos parâmetros reológicos da *Chlorella minutissima*, cultivada em reator *Air-Lift***. 2019. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O presente trabalho avaliou a composição celular e o comportamento reológico de suspensões da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em chorume (lixiviado de aterro sanitário) em reatores operados no regime batelada e semi-contínuo. Os cultivos foram feitos em diferentes condições, em reator do tipo *Air Lift*, em que foram avaliados os efeitos dos fatores: concentração do chorume (CC), concentração de CO₂ na corrente gasosa (CG), vazão de aeração no reator (VA) e vazão da corrente de alimentação (Q). Foi utilizado o arranjo ortogonal de Taguchi L₉ para avaliar os efeitos desses quatro fatores nas seguintes variáveis de resposta: parâmetros reológicos (índice de comportamento e índice de consistência) e produtividade em: Biomassa (PB), Lipídeos (PL), Proteínas (PP) e Açúcares Redutores (PAR). Os resultados demonstraram que a utilização do reator em regime semi-contínuo contribuiu para o aumento dos teores em lipídeos e proteínas em cerca de 30% em comparação aos resultados obtidos no regime batelada. Em contrapartida, o tratamento de efluentes no regime semi-contínuo se apresentou menos eficaz, com redução do valor da DQO na faixa de 17%, sendo esse valor 76% menor ao valor mínimo de redução obtida no regime em batelada. Além disso, verificou-se também que, apesar de não favorecer a produção de açúcares redutores, o regime semi-contínuo promoveu um teor máximo de açúcares 38% maior que o encontrado no regime em batelada. Após a análise estatística, observou-se que a concentração de lixiviado foi o fator mais influente na análise da composição química celular, sendo significativo nas análises de produtividade em lipídeos, proteínas e açúcares redutores. Na análise estatística dos parâmetros reológicos, a vazão de aeração se apresentou como o fator mais influente, sendo significativo na análise do índice de comportamento e relevante na análise do índice de consistência. Em relação a esses parâmetros citados, observou-se que a suspensão de microalgas apresentou comportamento de um fluido dilatante, comportamento também encontrado por diversos autores na literatura. O trabalho experimental desenvolvido proporcionou avaliar de maneira completa a influência de diversos fatores de processo, bem como a influência dos sistemas de cultivo, sobre a composição química celular e os parâmetros reológicos da suspensão de microalgas, possibilitando novas linhas de pesquisa que venham agregar valor aos resultados obtidos.

Palavras-chave: Reologia. *Chlorella minutissima*. Lixiviado. *Air Lift*.

ABSTRACT

SANTOS, W. R. **Analysis of process variables in cell composition and rheological parameters of *Chlorella minutissima*, grown in Air-Lift.** 2019. 124p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The present work evaluated the cellular composition and the rheological behavior of suspensions of *Chlorella minutissima* cultivated in slurry (landfill leachate) in reactors operated in batch and semicontinuous regime. Cultivations were performed under different conditions, in an Air Lift reactor, and the effects of the factors were evaluated: slurry concentration (SC), CO₂ concentration in the gas stream (CC), aeration flow in the reactor (AF) and flow of the feed stream (Q). The Taguchi L₉ orthogonal arrangement was used to evaluate the effects of these four factors on the following response variables: rheological parameters (behavior index and consistency index) and productivity in: Biomass (BP), Lipid (LP), Reducing Sugars (RSP) and Proteins (PP). The results showed that the use of the reactor in a semicontinuous regime contributed to the increase in lipid and protein contents by about 30% compared to the results obtained in the batch regime. In contrast, effluent treatment in the semi-continuous regime was less effective, with a reduction in the COD value by 17%, which is 76% lower than the minimum reduction obtained in the batch regime. In addition, it was also found that, while not increasing the production of reducing sugars, the semi-continuous regime promoted a maximum sugar content 38% higher than that found in the batch regime. After the statistical analysis, it was observed that the leachate concentration was the most influential factor in the analysis of the cellular chemical composition, being significant in the yield analysis of lipids, proteins and reducing sugars. In the statistical analysis of rheological parameters, the aeration flow was the most influential factor, being significant in the behavior index analysis and relevant in the consistency index analysis. Regarding these parameters, it was observed that the suspension of microalgae showed the behavior of a dilating fluid, a behavior also found by several authors in the literature. The experimental work developed allowed to fully evaluate the influence of several process factors, as well as the influence of the cultivation systems, on the cellular chemical composition and the rheological parameters of the microalgae suspension, enabling new lines of research that may add value to results obtained.

Key-words: Rheology. *Chlorella sp.* Slurry. *Air Lift*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Emissões de CO ₂ , em gigatoneladas, relacionadas à energia global entre os anos de 2000 e 2017.....	25
Figura 2 - Evolução da produção de biodiesel (B100) – 2008-2017 no Brasil.	26
Figura 3 - Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100) no Brasil – 2008-2017.	27
Figura 4 - Possíveis aplicações de microalgas.....	29
Figura 5 - Esquema de reprodução da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> : (a) crescimento, (b) maturação, (c) divisão e (d) célula vegetal em aumento.....	32
Figura 6 - Exemplo de cinética de um sistema semi-contínuo.	35
Figura 7 - Exemplo de curva de crescimento de um cultivo microalgal em um reator descontínuo.....	38
Figura 8 - Representação esquemática do processo de cultivo de microalgas.	39
Figura 9 - Exemplos de biorreatores do tipo tanque: (a) biorreator circular e (b) <i>raceway</i>	40
Figura 10 - Fotobiorreatores avançados para produção de microalgas: (A) colunas de bolhas inclinado; (B) <i>Air Lift</i> de tubos concêntricos; (C) <i>Air Lift</i> plano; (D) <i>Air Lift</i> tela plana da Subitec; (E) tubular com misturador estático Kunii; (F) tubular com aletas de agitação estática; (G) <i>Air Lift</i> com fluxo e geração de redemoinhos; (H) Couette Taylor.....	41
Figura 11 - Imagem da microalga <i>Chlorella minutissima</i> retirada em microscópio biológico trinocular (40X).	48
Figura 12 - Cultura estoque da microalga <i>Chlorella minutissima</i> mantido no cepário do Laboratório de Engenharia de Microalgas da Escola de Engenharia de Lorena.	48
Figura 13 - Representação esquemática do fotobiorreator <i>Air Lift</i> de tubos centrais.....	50
Figura 14 - Etapas de cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> : (a) cultivo em erlenmeyer; (b) cultivo em recipiente transparente; (c) cultivo em reator <i>Air Lift</i>	51
Figura 15 : Reação calorimétrica entre a glicose e o reagente DNS.	59
Figura 16 - Curvas de crescimento das suspensões de microalgas para cada condição experimental no regime batelada.	62
Figura 17 - Gráficos de composição química celular das biomassas produzidas no regime batelada.	65
Figura 18 – Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em biomassa.....	66

Figura 19 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em lipídeos.....	67
Figura 20 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em açúcares redutores.....	69
Figura 21 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em proteínas.....	70
Figura 22 - Representação do comportamento reológico de cada experimento realizado.	73
Figura 23 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de comportamento (n).....	76
Figura 24 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de consistência (k).....	77
Figura 25 - Curvas de crescimento das suspensões de microalgas no regime semi-contínuo.....	78
Figura 26 - Gráficos de composição celular das suspensões de microalgas no regime semicontínuo.....	82
Figura 27 - Comparação da produtividade média em biomassa em ambos regimes de cultivo.....	83
Figura 28 - Comparação do teor médio em lipídeos em ambos regimes de cultivo.....	83
Figura 29 - Comparação do teor médio em proteínas em ambos regimes de cultivo.....	84
Figura 30 - Comparação do teor médio em açúcares em ambos regimes de cultivo.....	84
Figura 31 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em biomassa.....	86
Figura 32 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em lipídeos.....	89
Figura 33 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em açúcares redutores.....	92
Figura 34 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em proteínas.....	95
Figura 35 - Reogramas da suspensão de <i>Chlorella minutissima</i> , nas diferentes condições de processo.....	98
Figura 36 - Reograma da condição experimental 1.....	99
Figura 37 - Reograma da condição experimental 2.....	99

Figura 38 - Reograma da condição experimental 3.	99
Figura 39 - Reograma da condição experimental 4.	99
Figura 40 - Reograma da condição experimental 5.	99
Figura 41 - Reograma da condição experimental 6.	99
Figura 42 - Reograma da condição experimental 7.	100
Figura 43 - Reograma da condição experimental 8.	100
Figura 44 - Reograma da condição experimental 9.	100
Figura 45 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de comportamento (n).	101
Figura 46 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de consistência (k).	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do potencial de produção de óleo e biodiesel de microalgas em relação a outras espécies vegetais.	28
Tabela 2 - Composição química em massa (%) da biomassa seca de algumas espécies de microalgas.	30
Tabela 3 - Parâmetros de controle e níveis usados na matriz L9 de Taguchi.	52
Tabela 4 - Arranjo ortogonal da matriz Taguchi L9 aplicada nesse trabalho	53
Tabela 5 - Resultados referentes aos experimentos realizados em regime batelada.....	63
Tabela 6 - Redução da Demanda Química de Oxigênio proporcionada por cada experimento no regime batelada.	73
Tabela 7 - Ajuste do modelo matemático Herschel-Bulkley ao comportamento reológico apresentado pelo cultivo de microalgas no regime batelada.	74
Tabela 8 - Resultados referentes aos experimentos realizados em regime semicontínuo...80	
Tabela 9 - Produtividade em biomassa obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.....	85
Tabela 10 - Análise de variância sobre a produtividade em biomassa obtida no regime semi-contínuo.....	87
Tabela 11 - Produtividade em lipídeos obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.....	90
Tabela 12 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade em lipídeos obtida no regime semi-contínuo.....	91
Tabela 13 - Produtividade em açúcares obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.....	93
Tabela 14 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade em açúcares obtida no regime semi-contínuo.....	95
Tabela 15 - Produtividade em proteínas obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.....	96
Tabela 16 - Análise de variância sobre a produtividade em proteínas obtida no regime semi-contínuo.....	97
Tabela 17 - Redução da Demanda Química de Oxigênio proporcionada por cada experimento em regime semi-contínuo.....	97

Tabela 18 - Índice de comportamento em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.....	103
Tabela 19 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o índice de comportamento obtido no regime semi-contínuo.	105
Tabela 20 - Índice de consistência em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.	105
Tabela 21 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o índice de consistência obtido no regime semi-contínuo.	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens de cada processo de colheita de microalgas	39
Quadro 2 - Comparação entre diferentes tipos de biorreatores e suas respectivas vantagens e desvantagens.....	42
Quadro 3 - Relação de algumas publicações que utilizaram a metodologia de Taguchi para a interpretação e resultados de cultivos de microalgas.	47

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CC	Concentração de chorume (%)
CG	Concentração de gás carbônico (% vvm)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNS	cido 3,5-dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio (mg O ₂ /L)
GL	Graus de Liberdade
IEA	Agência Internacional de Energia
PAR	Produtividade volumétrica em açúcares redutores (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
PB	Produtividade volumétrica em biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
PL	Produtividade volumétrica em lipídeos (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
PP	Produtividade volumétrica em proteínas (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Q	Vazão de alimentação (L/d)
SMQF	Soma média quadrática dos fatores
SQF	Soma quadrática dos fatores
VA	Vazão de aeração (vvm)
VVM	Razão volume de ar por minuto/volume útil do reator

LISTA DE SÍMBOLOS

AR%	Teor de açúcares redutores (%)
C%	Teor de cinzas (%)
F	Teste F
k	Índice de consistência (cP)
L%	Teor de lipídeos (%)
n	Índice de comportamento (adimensional)
p	Teste p
P%	Teor de proteínas (%)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1	Contexto dos biocombustíveis no Brasil	25
3.2	Microalgas	29
3.2.1	Classificação	29
3.2.2	Composição celular.....	30
3.2.3	Microalgas do gênero <i>Chlorella</i>	31
3.3	Meios de cultivo.....	32
3.3.1	Macronutrientes	33
3.3.2	Micronutrientes	34
3.3.3	Vitaminas	34
3.4	Sistemas de cultivo	34
3.4.1	Sistema descontínuo	34
3.4.2	Sistema semi-contínuo.....	35
3.4.3	Sistema contínuo.....	35
3.5	Controle de crescimento e colheita.....	36
3.5.1	Fatores que influenciam o crescimento microalgal	36
3.5.2	Crescimento microalgal	37
3.5.3	Colheita da biomassa	38
3.6	Biorreatores.....	40
3.6.1	Tanques	40
3.6.2	Fotobiorreatores	41
3.7	Uso de efluentes no cultivo de microalgas	42
3.8	Reologia.....	43
3.9	Fatores que influenciam a reologia	45
3.10	Planejamento de experimentos	46
3.10.1	Metodologia Taguchi	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	Espécie de microalga utilizada nos experimentos	48
4.2	Preparo do inóculo	50
4.3	Meios e condições de cultivo para o crescimento da microalga <i>Chlorella minutissima</i>	51

4.4 Planejamento experimental	52
4.5 Análises Reológicas	53
4.6 Controle de crescimento da biomassa microalgal	54
4.7 Colheita da Biomassa.....	54
4.8 Extração de lipídeos	55
4.9 Determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta.....	56
4.9.1 Preparo da amostra.....	56
4.9.2 Digestão das amostras	56
4.9.3 Destilação e titulação das amostras.....	57
4.10 Determinação do Teor de Cinzas (%C)	57
4.11 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	58
4.11.1 Preparo das amostras.....	58
4.11.2 Digestão e análise da absorvância.....	60
4.12 Determinação da produtividade em açúcares redutores por método calorimétrico	60
4.12.1 Hidrólise da biomassa	60
4.12.2 Reação com o DNS	61
4.13 Análise estatística.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
5.1 Resultados dos cultivos em regime batelada.....	62
5.1.1 Avaliação do crescimento celular	62
5.1.2 Avaliação da composição química celular da microalga	63
5.1.3 Análise estatística.....	66
5.1.3.1 Produtividade em Biomassa (PB)	66
5.1.3.2 Produtividade em Lipídeos (PL)	67
5.1.3.3 Produtividade em Açúcares Redutores (PAR).....	68
5.1.3.4 Produtividade em Proteínas (PP)	71
5.1.4 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	73
5.1.5 Análises reológicas	73
5.1.5.1 Ajuste de modelos matemáticos ao comportamento reológico do cultivo de microalgas.	74
5.1.5.2 Análise estatística dos índices de comportamento (n) e consistência (k)	75
5.2 Resultados dos cultivos em regime semi-contínuo	78
5.2.1 Avaliação do crescimento celular	78
5.2.2 Avaliação da composição química celular da microalga	80

5.2.3 Análises estatísticas	85
5.2.3.1 Produtividade em Biomassa (PB)	85
5.2.3.2 Produtividade em Lipídeos (PL).....	88
5.2.3.3 Produtividade em Açúcares Redutores (PAR).....	92
5.2.3.4 Produtividade em Proteínas (PP)	96
5.2.4 Demanda Química de Oxigênio (DQO)	96
5.2.5 Análises reológicas	97
5.2.5.1 Análise estatística dos índices de comportamento (n) e consistência (k)	102
6. CONCLUSÕES GERAIS	106
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	107
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICES	121
APÊNDICE A – Curva de Calibração para determinação da DQO	121
APÊNDICE B – Curva de Calibração para determinação da concentração de glicose.....	121
APÊNDICE C – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 1 – Semicontínuo.	122
APÊNDICE D – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 2 – Semicontínuo.....	122
APÊNDICE E – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 3 – Semicontínuo.	122
APÊNDICE F – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 4 – Semicontínuo.....	123
APÊNDICE G – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 5 – Semicontínuo.....	123
APÊNDICE H – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 6 – Semicontínuo.....	123
APÊNDICE I – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 7 – Semicontínuo.	124
APÊNDICE J – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 8 – Semicontínuo.	124
APÊNDICE K – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 9 – Semicontínuo.....	124

1 INTRODUÇÃO

A busca por novas fontes de energia capazes de suprir a demanda global e, simultaneamente, substituir os combustíveis fósseis, expande-se anualmente. A urgência do combate ao aquecimento global impulsiona diversas pesquisas ao redor do planeta com o intuito de reduzir a quantidade de gases poluentes na atmosfera, seja no desenvolvimento de biocombustíveis ou na biofixação dos gases por plantas e micro-organismos.

No Brasil, a combustão do diesel tem sido, há décadas, a principal causa de emissão de gases poluentes, pois a maior parcela do sistema de transporte de cargas se baseia na malha rodoviária, composta majoritariamente pelos caminhões (CORREA; RAMOS, 2010). Dentro desse contexto, o biodiesel surge como um forte candidato na substituição do diesel comercial produzido a partir de petróleo.

Sabe-se que o biodiesel pode ser obtido a partir de diferentes espécies de oleaginosas, tais como a mamona, dendê, canola, girassol, amendoim, soja e algodão. Matérias-primas de origem animal, como o sebo bovino e gordura suína, também podem ser utilizadas na fabricação do biodiesel.

No entanto, projetos experimentais realizados em todo o mundo têm destacado as microalgas como fonte de produção do biodiesel, devido à enorme quantidade de espécies desses micro-organismos no planeta e à grande capacidade de adaptação aos mais diversos climas e meios de cultivo. Além disso, a produtividade em óleo das microalgas é muito superior à de vegetais, como por exemplo a soja e, ao contrário desse grão, as microalgas utilizam uma área de cultivo muito menor, o que diminui o custo do processo de produção de biomassa.

A cultura de microalgas é um processo de fácil execução e com grandes aplicabilidades, contudo, deve-se atentar à influência de fatores ambientais durante a operação. Temperatura, pH, iluminação e disponibilidade de fonte de carbono são alguns dos fatores que podem influenciar a concentração de microalgas no cultivo, positiva ou negativamente. Portanto, esses fatores devem ser controlados de forma minuciosa para que a biomassa produzida possua a qualidade desejada.

Ainda que as microalgas possuam elevada produtividade lipídica, o seu cultivo energético em larga escala demanda elevado conteúdo de nutrientes. Nesse sentido, diferentes tipos de efluentes têm sido testados como fontes de água e nutrientes para o cultivo das microalgas, o que pode reduzir visivelmente os custos de produção. 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. Com esse princípio, a utilização de microalgas para o tratamento de efluentes apresenta-se como alternativa viável e de baixo custo, pois a redução da Demanda Química de Oxigênio verificada é significativa.

Tomando como base esse raciocínio, fica evidente que a utilização de cultivos de microalgas para os mais diversos fins é uma oportunidade de gerar combustíveis de alta qualidade e que consigam suprir as demandas de um mercado que necessita de inovação e substituição de produtos que impactam o meio ambiente de forma negativa.

Apesar de ser um processo ainda pouco explorado em grande escala, a obtenção de energia a partir das microalgas ganha adeptos em muitas partes do mundo, como nos Estados Unidos, Alemanha, Israel, Bélgica, França e Nova Zelândia, os quais desenvolvem pesquisas nesta área há cerca de uma década (LI et al., 2011; PRAVEENKUMAR et al., 2012). O incentivo à utilização de microalgas como fonte de matéria prima para produção de biocombustíveis (como o biodiesel, o biogás e o bioetanol), é decorrente dos grandes avanços da engenharia de biosistemas nesse meio, mas que ainda apresenta grandes lacunas a serem otimizadas (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2015; TIAN et al., 2016).

Dentre outros desafios, a construção de reatores que viabilizem o cultivo das microalgas em grande escala e que permitam maior controle sobre as condições operacionais se destaca, uma vez que os elevados custos de construção e operacionalidade dos fotobiorreatores são fatores limitantes para a utilização comercial dos mesmos, não apresentando condições para suportar de forma economicamente viável o cultivo em grande escala (HE; WANG; SONG, 2016; MAGRO et al., 2016).

Nesse contexto, a utilização de biorreatores contínuos para o crescimento celular, apesar de pouco estudada, seria de grande vantagem quando comparado aos modos em batelada e semi-contínuo. Segundo Lourenço (2006), as vantagens em se optar por biorreatores contínuos para o crescimento das microalgas, são: (i) maior produtividade do processo (reduzindo os tempos “mortos” ou não-produtivos); (ii) obtenção de uma biomassa mais uniforme; (iii) manutenção das células em um mesmo estado fisiológico (proporcionando dados importantes para a otimização dos processos); (iv) menor necessidade de mão-de-obra; (v) maior facilidade no emprego de mecanismos de controle avançados.

A escolha por um biorreator do tipo Air Lift para a utilização nesse projeto se deu pela necessidade de obter maior controle sobre contaminações e demais influências do meio

externo. Esse tipo de controle é prejudicado quando se utiliza biorreatores abertos, como por exemplo as Raceways.

Numa linha de pesquisa desse tipo, o comportamento reológico ocupa posição de destaque, visto que no desenvolvimento de rotinas industriais deve-se levar em consideração as características dos materiais a serem processados/produzidos afim de que haja a correta utilização de equipamentos e otimização de processos. Nesse âmbito, a reologia surge como uma ferramenta na caracterização dos materiais utilizados pelo setor industrial e possibilita a otimização de processos a partir do correto manuseio de equipamentos como bombas, trocadores de calor, agitadores, etc.

Tendo em vista a produção de microalgas em escala industrial, a determinação dos parâmetros reológicos apresenta as características dos cultivos microalgais que devem ser levados em consideração no momento de se projetar reatores e demais equipamentos. Com características de fluidos Não Newtonianos, as suspensões de microalgas têm sua viscosidade aumentada a partir do aumento da tensão de cisalhamento. Tal fato deve ser lembrado ao se projetar reatores que podem sofrer com incrustações (PELEGRINE et al., 2016; HAMINIUK et al., 2009; SINGH; HELDMAN, 2014).

A realização desse trabalho possui contribuições no âmbito social e tecnológico. Quanto à sociedade, a essa é apresentada uma nova abordagem para o tratamento de efluentes domésticos e a geração de produtos de valor comercial, sendo capaz de criar empregos e melhorar o comércio. Já no setor tecnológico, esse trabalho apresenta novas formas de produção de biomassa capaz de gerar produtos de caráter energético, alimentício, coméstico e de higiene pessoal.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Analisar o comportamento reológico de suspensões de microalga *Chlorella minutissima*, cultivadas em chorume, em reator do tipo *Air Lift*, para diferentes tempos e condições de processo, além de caracterizar sua composição química.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Para que o objetivo principal descrito anteriormente fosse cumprido, os seguintes objetivos específicos foram executados:

- Avaliar os efeitos da concentração do chorume, da concentração de CO₂ na corrente gasosa, vazão de aeração no reator e da vazão da corrente de alimentação, utilizando-se de um arranjo ortogonal de Taguchi L₉, nas seguintes variáveis de resposta: parâmetros reológicos da suspensão (índice de comportamento e índice de consistência) e composição celular (em termos dos teores de lipídeos, proteínas e carboidratos);
- Avaliar a redução da DQO promovida pelo tratamento com a microalga *Chlorella minutissima* e comparar os resultados entre os regimes de cultivo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

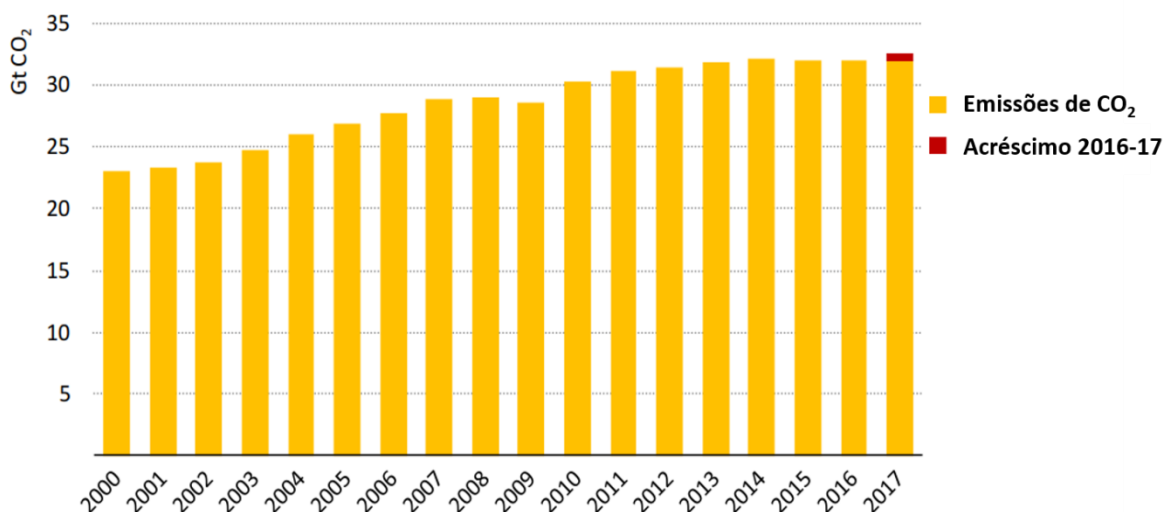
3.1 Contexto dos biocombustíveis no Brasil

O advento dos biocombustíveis abriu as portas para a pesquisa e produção de novas fontes energéticas capazes de substituir os combustíveis provenientes do petróleo. A substituição dos combustíveis de origem fóssil torna-se essencial devido à urgência de combate ao aquecimento global, ocasionado em grande parte pela emissão de gases poluentes, dentre eles o dióxido de carbono (CO₂). O setor energético é o responsável pela maior parte da emissão de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, englobando 67% da contribuição total e, dessa porcentagem, o setor de transportes é o que possui maior contribuição (LEITE; LEAL, 2007).

No ano de 2017, as emissões de CO₂ relacionadas com o setor energético cresceu 1,4% em relação ao ano anterior, o que representa um acréscimo de 460 milhões de toneladas de dióxido carbono na atmosfera (IEA, 2017). Tal aumento ocorre após três anos de redução na emissão desse gás poluente cuja presença na atmosfera é um dos principais fatores para o aquecimento global.

A Figura 1 apresenta a quantidade de CO₂ emitida relacionada ao setor energético global, em Gigatoneladas, entre os anos de 2000 e 2017.

Figura 1 - Emissões de CO₂, em gigatoneladas, relacionadas à energia global entre os anos de 2000 e 2017.



Fonte: IEA (2017).

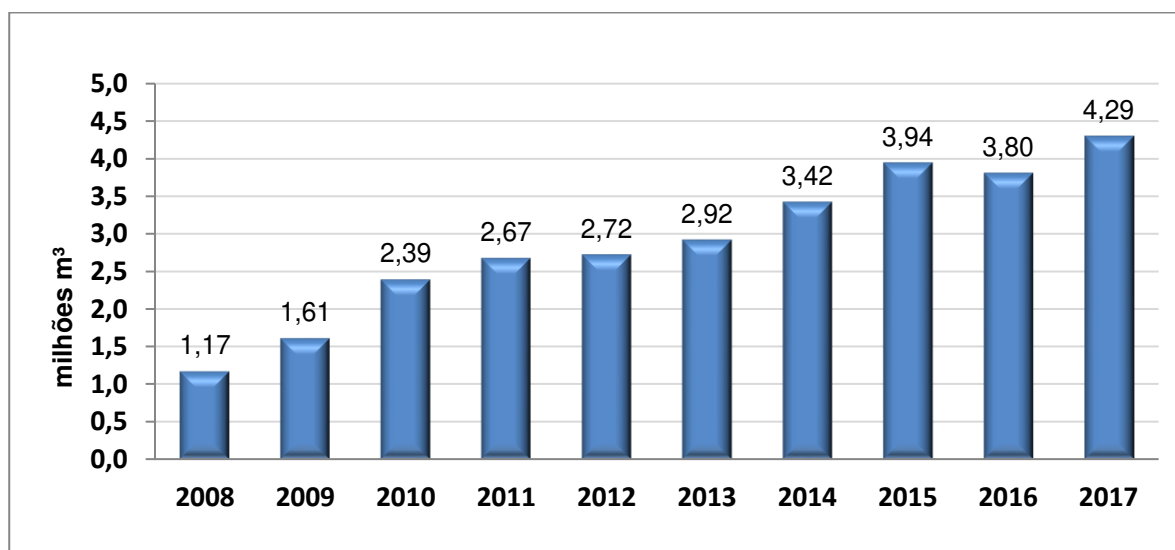
O IEA (2017) ainda afirma que as causas para o acréscimo na emissão são: O crescimento econômico global equivalente a 3,7%, a fraqueza dos esforços de eficiência energética e a redução no preço de combustíveis de origem fóssil.

Dentre os biocombustíveis existentes capazes de suprir grande parte da demanda energética global, o etanol e o biodiesel são os que possuem maior destaque (MASIERO; LOPES, 2008a).

A utilização da cana-de-açúcar na produção de etanol se intensificou a partir da quebra da bolsa de Nova Iorque em 1929 pois o açúcar, principal produto extraído da cana e grande fonte de renda brasileira na década de 1930, teve seu mercado derrocado juntamente com o da agricultura brasileira. Apesar das experiências brasileiras com etanol datarem do início do século XX, somente em 1925 a primeira comprovação da eficiência do etanol de cana-de-açúcar como combustível automotivo ocorreu: Um carro movido a etanol realizou uma viagem entre Rio de Janeiro e São Paulo, percorrendo uma distância de 430 km (TÁVORA, 2011).

O biodiesel, assim como o etanol, surgiu como candidato viável na substituição de um combustível fóssil. De acordo com a Lei nº.9.478, do ano de 1978, parágrafo 24 o biodiesel é definido como “um combustível derivado de biomassa renovável para a utilização em motores de combustão interna por ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” o biodiesel brasileiro está com uma produção em crescente evolução, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Evolução da produção de biodiesel (B100) – 2008-2017 no Brasil.

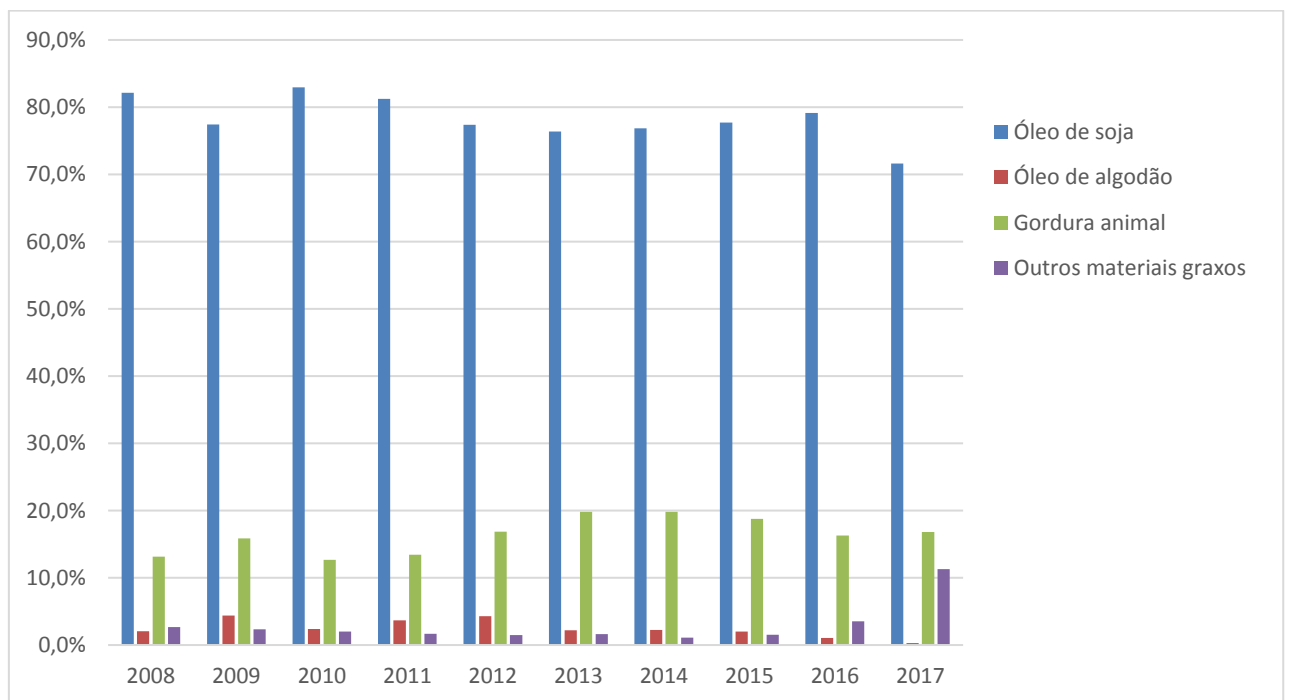


Fonte: ANP (2017).

Graças à capacidade de ser produzido a partir de diversas fontes naturais, a produção nacional de biodiesel atingiu a marca de 4,3 milhões de m³ em 2017, apresentando um aumento de 12,89% em relação ao ano de 2016. Dentre as matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel, destaca-se a utilização do óleo de soja, que representa 71,6% do total anual, seguido pela gordura animal (origem bovina, suína e de frango) com 16,8% (ANP/SPC, 2017).

A representação gráfica da participação de cada matéria-prima na produção total de biodiesel está apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100) no Brasil – 2008-2017.



Fonte: ANP (2017)

Apesar de ser a principal matéria-prima na produção de biodiesel, a utilização do óleo de soja, o qual também é empregado como alimento, levanta sérias questões sociais, principalmente em países cuja fome e escassez de alimentos estão presentes (CARVALHO JÚNIOR, 2010).

Dentro desse cenário, a biomassa de microalgas vem despertando o interesse e ganhando destaque como uma fonte de produção de óleo capaz de se reproduzir em áreas menores do que as utilizadas para o cultivo de vegetais. Além disso, o cultivo de microalgas auxilia na biofixação do CO₂ da atmosfera e pode atuar no tratamento de águas residuais (MILANO et al., 2016).

Segundo Mata, Martins e Caetano (2010) a biomassa microalgal possui produtividade em óleo entre 90 e 220 vezes maior que a soja e utiliza uma área produtiva até 180 vezes menor. Tal afirmação pode ser verificada após a análise da Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação do potencial de produção de óleo e biodiesel de microalgas em relação a outras espécies vegetais.

Matéria-prima	Teor de óleo (%)	Produtividade em óleo (L.ha⁻¹.a⁻¹)	Área necessária (m².ano⁻¹.kg⁻¹)	Produtividade em biodiesel (kg.ha⁻¹.a⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Carmelina	42	915	12	809
Girassol	40	1070	11	946
Palma	36	5366	2	4747
Microalga	30	58700	0,2	51927
(Teor reduzido)				
Microalga	50	97800	0,1	86515
(Teor médio)				
Microalga	70	136900	0,1	121104
(Teor alto)				

Fonte: Adaptado de (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Categorizado como biodiesel de terceira geração, o biodiesel produzido a partir de microalgas ainda enfrenta diversos obstáculos para a produção em larga escala devido ao seu alto custo operacional. Em comparação com o biodiesel produzido com óleo de soja, o custo para a produção de 1 litro de combustível a partir de microalgas é, em média, 1,50 US\$ superior. A superioridade do custo de produção de combustível a partir de microalgas se dá, em grande parte, pela utilização de reagentes químicos e operações unitárias que encarecem o processo. Por esse motivo, torna-se necessário a busca de alternativas mais viáveis de produção, como por exemplo, acoplar uma estação de cultivo de microalgas ao canal de emissão de gases poluentes de uma unidade geradora (indústrias e termelétricas), proporcionando assim, redução do impacto ambiental (RASTOGI et al., 2018a).

3.2 Microalgas

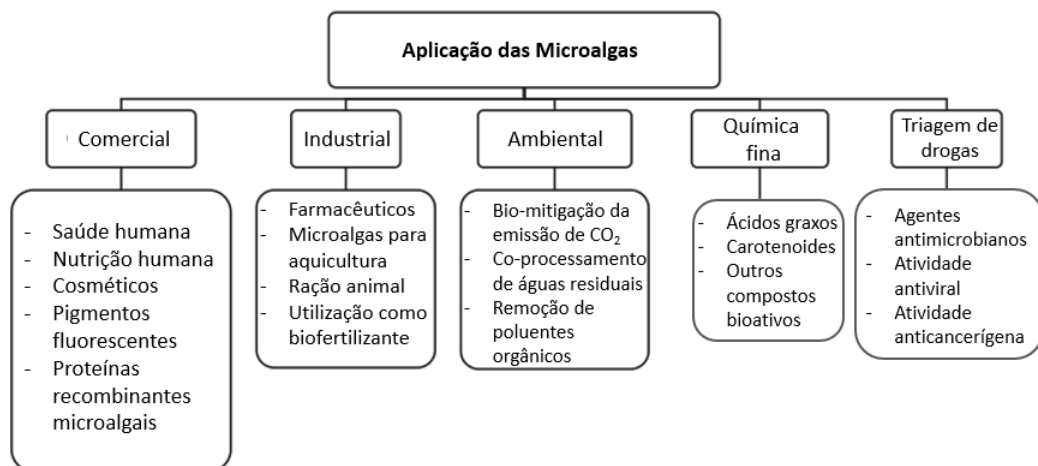
3.2.1 Classificação

As microalgas são micro-organismos eucarióticos presentes nos mais variados ecossistemas, tanto aquáticos quanto terrestres, e capazes de crescer em condições adversas devido a sua estrutura celular. A estimativa é que existam entre 200.000 e 1 milhão de espécies de microalgas, nas quais podem ser divididas em quatro grandes grupos: Algas verdes (*Chlorophyceae*), algas marrons (*Chrysophyceae*), diatomáceas (*Bacillariophyceae*) e as verde-azul (*Cyanophyceae*) (DERNER, et al. 2006).

Apesar da grande variedade de espécies, três fatores são primordiais para o crescimento das microalgas: água, fonte de carbono e luz solar. A fonte de nutrientes para o crescimento das microalgas pode ter origens diversas, desde os *habitats* aquáticos (rios, mares, lagos) até águas residuais e efluentes. Além de capturarem o dióxido de carbono da atmosfera, as microalgas são responsáveis pela produção de 50% do oxigênio atmosférico e, além disso, produzem compostos orgânicos utilizando a luz solar (NIGAM; SINGH, 2011; RIZWAN et al., 2018).

A grande variedade de espécies de microalgas possibilita as mais diversas aplicações industriais (VASSILEV; VASSILEVA, 2016). Além da produção de biocombustíveis, as microalgas podem ser aplicadas na alimentação humana, produção de ração animal, desenvolvimento de cosméticos, dentre outros (RIZWAN et al., 2018) como pode ser visualizado na Figura 4.

Figura 4 - Possíveis aplicações de microalgas.



Fonte: Adaptado de (RIZWAN et al., 2018).

3.2.2 Composição celular

Apesar da enorme variedade de espécies, a composição química de uma microalga assemelha-se quando comparada com a de outra espécie. Contudo, a composição celular pode variar de acordo com as condições ambientais na qual ela está submetida, como por exemplo: presença ou ausência de iluminação, variação de pH, temperatura, abundância de CO₂ no meio, etc (HO et al., 2013). De maneira geral, uma célula microalgal possui entre 60% e 80% de água e, após sua evaporação, o peso seco é representado, majoritariamente, por proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo esse último o maior foco de pesquisas devido ao potencial de produção de biocombustíveis (FON SING et al., 2013). A composição celular média de algumas espécies de microalgas pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química em massa (%) da biomassa seca de algumas espécies de microalgas.

Espécies	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12–17	14–22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella minutissima</i>	30	9	47
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina platensis</i>	46–63	8–14	4-9
<i>Spirulina máxima</i>	60–71	13–16	6-7

Fonte: (BECKER, 2013; HATTAB; GHALY, 2015; TAGLIAFERRO, 2017).

O teor de carboidratos presente nas microalgas inclui tanto os amidos quanto os carboidratos estruturais (glicose, manose, galactose) e sua caracterização, portanto, é realizada em fração mássica. Contudo, a quantidade de carboidratos presentes na microalga pode variar de acordo com as condições de cultivo à qual ela é submetida (TAGLIAFERRO et al., 2019). A quantidade em massa de lipídeos no interior da célula varia de espécie para espécie de microalga e, assim como os carboidratos, também pode variar de acordo com a forma de cultivo. A concentração de nitrato no meio de cultivo é um dos fatores que possui maior influência na quantidade de lipídeos produzida, pois, quando sua concentração é baixa, a célula tende a armazenar o lipídeo em se interior (ÖRDÖG et al., 2016).

A síntese de lipídeos pela microalga pode ocorrer através de uma fonte inorgânica de carbono, como por exemplo o CO₂, ou por uma fonte orgânica, no caso podendo ser representada pelo acetato, glicose, dentre outros. Dentre os dois tipos de lipídeos produzidos

pelas microalgas, os neutros (colesterol e triglicerídeos) e os polares (fosfolpídeos), os triglicerídeos possuem as melhores características para a conversão em biodiesel (KLINTHONG et al., 2015).

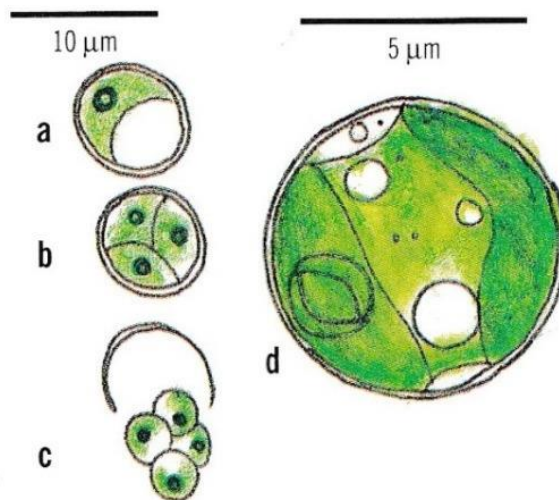
As microalgas do gênero *Chlorella* apresentam produtividade celular elevada e o tempo para o cultivo é relativamente menor quando comparada com os demais gêneros. Graças a isso, as microalgas desse gênero recebem grande foco e estímulo na otimização da produção em larga escala, pois os lipídeos produzidos por elas são excelentes candidatos para a conversão em biodiesel, cujo processo é caracterizado pela transesterificação do óleo em presença de álcool e ácido ou base (BRENNAN; OWENDE, 2010; HATTAB; GHALY, 2015; MASIERO; LOPES, 2008b).

Assim como os carboidratos e os lipídeos, as proteínas também possuem teor em massa significativo e sua função está atrelada à recepção dos raios luminosos pela célula da microalga. O principal uso das proteínas produzidas pelas microalgas é a nutrição humana, podendo ser comercializadas em variadas formas como líquidos e cápsulas ou até mesmo complementando a composição de bebidas, bolos e doces (BECKER, 2013; LÓPEZ et al., 2010; ZORN et al., 2017).

3.2.3 Microalgas do gênero *Chlorella*

As microalgas do gênero *Chlorella* são unicelulares, esféricas, eucarióticas e com diâmetro variando de 5µm a 10µm. Encontrada em mares, lagos e tanques, a *Chlorella* possui grande capacidade fotossintética pois possui mais de 2% de clorofila em seu interior, possibilitando crescimento acelerado e alto armazenamento de macronutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos (FAROOQ et al., 2013; MIN et al., 2011). Sua reprodução é assexuada e ocorre através da formação de autósporos, cuja liberação é realizada através do rompimento da parede celular (FRANCESCHINI et al., 2010). O processo de reprodução ocorre em três etapas: (a) crescimento, (b) maturação e (c) divisão e pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema de reprodução da microalga *Chlorella vulgaris*: (a) crescimento, (b) maturação, (c) divisão e (d) célula vegetal em aumento.



Fonte: (FRANCESCHINI et al., 2018).

Devido a esse tipo de reprodução, a taxa de crescimento da microalga do gênero *Chlorella* é elevada, possibilitando a geração de grande quantidade de biomassa em um intervalo de tempo relativamente baixo. Além disso, as microalgas também podem apresentar três tipos de metabolismo distintos: fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico. As microalgas cujo metabolismo é o fotoautotrófico utilizam a fotossíntese como forma de geração de nutrientes necessários para a sua sobrevivência (KAEWPINTONG et al., 2007; TERRY; RAYMOND, 1985). Já no metabolismo heterotrófico, as microalgas utilizam a glicose e/ou o acetato, por exemplo, como fonte principal de carbono, ou seja, compostos orgânicos dissolvidos no meio de cultivo (BOROWITZKA, 1999; KIM; HUR, 2013). O metabolismo mixotrófico permite às microalgas realizar a fotossíntese e consumir, ao mesmo tempo, o carbono inorgânico e orgânico, ou seja, elas possuem a capacidade de se desenvolver em condições autotróficas e heterotróficas. A *Chlorella minutíssima* é um exemplo de microalga que possui a capacidade de se adaptar aos três tipos de metabolismo (CHEN et al., 2011; TERRY; RAYMOND, 1985).

3.3 Meios de cultivo

Define-se como meio de cultivo o ambiente delimitado e específico, composto por nutrientes e demais elementos necessários, no qual a microalga se desenvolve. Dentre os nutrientes necessários para o cultivo, destacam-se os macronutrientes essenciais (carbono,

hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio e ferro), responsáveis por diversas funções estruturais e metabólicas, os micronutrientes, responsáveis pela constituição e atividade enzimática e as vitaminas, responsáveis pelo transporte de gases, como o CO₂ e atuação como coenzima (DRAGONE et al., 2011; MORENO-GARCIA et al., 2017).

3.3.1 Macronutrientes

Os macronutrientes são essenciais na constituição das estruturas das biomoléculas, na composição de membranas e do meio intracelular, além de regulares as atividades metabólicas da célula e participarem das trocas de energia (PRAVEENKUMAR et al., 2012).

- **CARBONO:** Dentre os principais macronutrientes, o carbono provavelmente figura como o mais importante. Responsável por 50% da massa seca da microalga, o carbono participa do processo de fotossíntese dos cultivos fotoautotróficos na forma de CO₂ gasoso e na forma de substrato orgânico, como a glicose ou sal (acetato) nos cultivos heterotróficos e mixotróficos (OHSEI et al., 2009; ZHAO et al., 2015).

Sabe-se que o CO₂ contribui para o crescimento celular de maneira geral, contudo, cada espécie de microalga requer uma suplementação de CO₂ específica no seu meio. Para a *Chlorella sp.*, uma suplementação de 5% de dióxido de carbono é a adequada enquanto que a *Chlorella minutíssima* necessita de apenas 2% de suplementação desse gás para o crescimento ser aprimorado (AMARAL, 2018).

- **NITROGÊNIO:** Após o carbono, o nitrogênio se destaca como o segundo macronutriente essencial. Responsável pela composição estrutural de proteínas, pigmentos fotossintetizantes e ácidos nucleicos, o nitrogênio é capaz de aumentar ou diminuir a concentração de proteínas e clorofila nas células, dependendo de sua concentração no meio, pois influencia diretamente na taxa de divisão celular (MAKAREVICIENE et al., 2011; ÖRDÖG et al., 2016). Uma elevada concentração de nitrato no meio de cultivo auxilia na formação e retenção de maior quantidade de lipídeos na célula (AMARAL, 2018; BECKER, 2013). Diversas fontes de nitrato podem ser utilizadas no meio de cultivo, como por exemplo a amônia e a ureia (WIDJAJA; CHIEN; JU, 2009).

- **FÓSFORO:** Além do nitrogênio, o fósforo também atua de maneira significativa no metabolismo da microalga sendo associado aos processos de síntese de ATP, ácidos nucleicos e fosfoenzimas, bem como participar de processos de trocas energéticas (AMARAL, 2018; PACHACAMA et al., 2016; SALAMA et al., 2017).

3.3.2 Micronutrientes

Os micronutrientes atuam na atividade de várias enzimas, além de fazer parte de suas composições estruturais. São eles: cobalto, boro, molibdênio, manganês, zinco, vanádio, cobre e selênio (AMARAL, 2018; BECKER, 2013).

3.3.3 Vitaminas

Para a criação de um meio de cultivo artificial, a adição de vitaminas é essencial para que todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento completo das microalgas estejam presentes. Dessa forma, as vitaminas que comumente são adicionadas ao meio de cultivo são: Tiamina (B1), Biotina (B7) e Cianocobalamina (B12), cujas funções estão relacionadas à atividade enzimática e transporte de gases (AMARAL, 2018; SMITH, 1975).

3.4 Sistemas de cultivo

Os sistemas de cultivo que podem ser aplicados na produção de biomassa de microalgas são divididos em: descontínuo (ou batelada), semicontínuo e contínuo. O tipo de sistema de cultivo a ser utilizado depende de diversos fatores como: disponibilidade de espaço, iluminação, temperatura, etc (RENGEL et al., 2012).

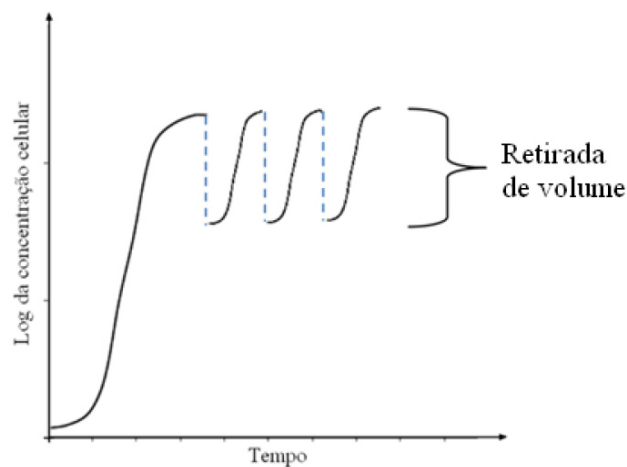
3.4.1 Sistema descontínuo

O sistema descontínuo é caracterizado pela sua operação simplificada, fácil manutenção e versatilidade. No cultivo descontínuo, o inóculo de microalgas (quantidade inicial de células que se reproduzirão durante o cultivo) é adicionado ao reator junto com o meio de cultivo e as condições para o seu crescimento podem ser modificadas durante o cultivo. Apesar da simplicidade e do baixo custo operacional, o sistema descontínuo tem algumas desvantagens, como por exemplo o tempo morto entre os cultivos e a baixa eficiência (CARVALHO, 2010; SÁNCHEZ MIRÓN et al., 2000).

3.4.2 Sistema semicontínuo

O sistema semicontínuo se caracteriza pela retirada de uma parcela do cultivo de microalgas e a substituição pelo meio de cultura, porém sem células. Dessa forma, as microalgas que ainda estão em sua fase de crescimento exponencial possuem maior probabilidade de crescerem, como pode ser observado na Figura 6, fazendo o sistema operar em reciclo.

Figura 6 - Exemplo de cinética de um sistema semi-contínuo.



Fonte: (JARENKOW, 2014).

O tipo de operação ilustrado na Figura 6 é muito produtivo, pois permite retirar grandes quantidades de biomassa e sem ter de finalizar o procedimento. Entretanto, as constantes retiradas de cultivo, aumentam a probabilidade de contaminação devido à manipulação constante. Visando combater esse tipo de problema, faz-se necessário um controle mais rígido de processo (MORWEISER et al., 2010; POSTEN; SCHAUB, 2009; VIEIRA, 2013).

3.4.3 Sistema contínuo

A metodologia aplicada nesse sistema consiste na retirada contínua de cultura de microalgas do reator e concomitante reposição do meio de cultivo novo. Dessa forma, a biomassa produzida apresentará maior uniformidade e qualidade quando comparada com os outros dois tipos de sistemas (JARENKOW, 2014; VIEIRA, 2013).

Apesar da melhor qualidade da biomassa produzida, o sistema contínuo possui custos de operação mais elevados em virtude da automatização do processo, além do custo com a

manutenção da temperatura e iluminação durante todo o cultivo (MORWEISER et al., 2010; RENGEL et al., 2012).

3.5 Controle de crescimento e colheita

Durante um cultivo de microalgas em um reator descontínuo, o tempo de crescimento certamente irá variar de acordo com a condição experimental aplicada. Por esse motivo, o controle do crescimento é essencial para a definição do momento correto de realizar a colheita da biomassa (BECKER, 2013) De maneira geral, o momento correto é definido como o início da fase de declínio do crescimento celular, pois a concentração de biomassa nessa fase já atingiu seu valor máximo.

3.5.1 Fatores que influenciam o crescimento microalgal

O tempo de crescimento de uma cultura de microalgas pode variar de diversas formas e é dependente das condições de cultivo pré-estabelecidas. Todavia, diversos fatores podem influenciar no crescimento do cultivo por isso o controle deve ser minucioso afim de manter a confiabilidade dos dados. Temperatura, agitação, iluminação e pH são exemplos desses fatores (JARENKOW, 2014).

- **TEMPERATURA:** A temperatura pode influenciar na taxa metabólica, na composição e no taxa de reprodução das microalgas. Tal fator, no entanto, influencia de maneira distinta cada espécie desse micro-organismo. A *Chlorella sp*, por exemplo, possui uma temperatura ótima de trabalho entre 25°C e 35°C (KINNUNEN; CRAGGS; RINTALA, 2014; VENKATA SUBHASH et al., 2014).
- **AGITAÇÃO:** Assim como a temperatura, a agitação do meio de cultivo microalgal é de extrema importância e sua ausência pode causar sérios problemas ao processo. A agitação possibilita a homogeneização do meio de cultivo, evita a deposição e sobreposição de células e, além disso, auxilia na distribuição dos nutrientes (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2012; OJO et al., 2014).
- **ILUMINAÇÃO:** A iluminação é fundamental para qualquer organismo que realize a fotossíntese. A energia luminosa absorvida pelas células influencia na quantidade de carbono fixado, na produção de biomassa e nas atividades enzimáticas. A iluminação de uma cultura de microalgas pode ser natural ou artificial e sua intensidade irá impactar na produção de proteínas (CHEIRSILP; TORPEE, 2012; KHALILI et al., 2015; SÁNCHEZ-SAAVEDRA; MAEDA-

MARTÍNEZ; ACOSTA-GALINDO, 2015). Além disso, diversos pesquisadores apontaram a influência da utilização de luzes de LED na composição química das microalgas. Pazos e Izquierdo (2011) apontaram que a utilização de luzes de LED de cor azul proporcionou uma produtividade lipídica superior à luz vermelha no cultivo de *Chlorella sp*, enquanto HULTBERG et al. (2014) verificaram que a utilização de luz azul obteve menor quantidade de biomassa (313 mg/L) do que aquela gerada na utilização de luz branca (1337,5 mg/L).

- VARIAÇÃO DE pH: A disponibilidade de diversos elementos químicos no meio de cultivo pode ser influenciada caso o controle de pH não seja efetuado com sucesso. A proporção entre as formas de carbono dissolvidas influencia na absorção de nutrientes e, conseqüentemente, no crescimento celular. A variação de pH no sistema pode ser ocasionada pelo consumo de dióxido de carbono, pelo consumo de substratos ou a degradação de metabólitos que foram produzidos. A condição de pH ótima para o cultivo de microalgas verdes está na faixa entre 4,0 e 8,5, portanto o controle da acidez do meio deve ser feito regularmente (LIU et al., 2013; VIEIRA, 2013; WU et al., 2012).

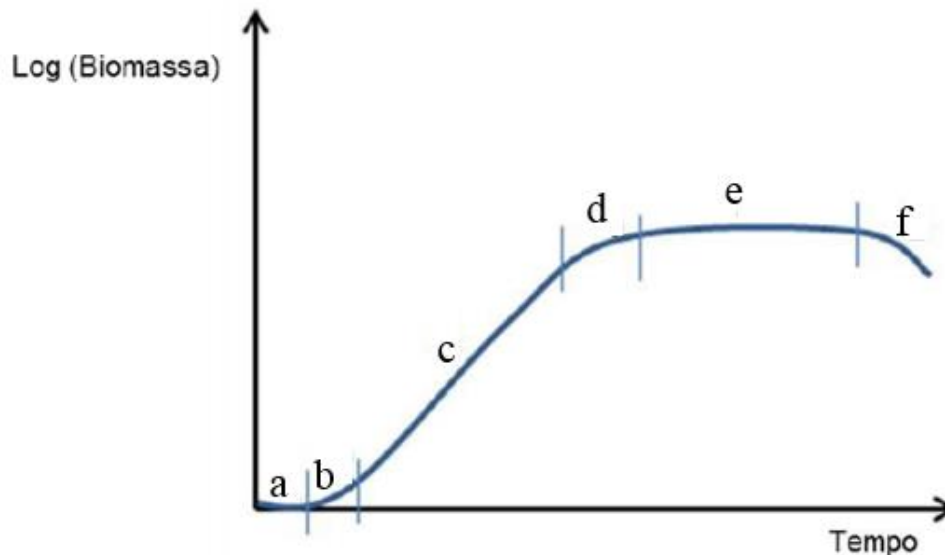
3.5.2 Crescimento microalgal

De acordo com Amaral (2018) e Vieira et al. (2013), os cultivos em batelada apresentam uma curva de crescimento característica (Figura 7), na qual se pode observar seis fases durante o processo, sendo elas:

- a) Fase de adaptação: nessa fase não há crescimento celular pois o inóculo está se adaptando ao meio de cultivo que, inicialmente, costuma ter toxicidade mais elevada;
- b) Fase de crescimento acelerado: nesse período a adaptação das células já ocorreu e essas começam a multiplicar-se. A velocidade específica de crescimento ainda é inferior ao valor da velocidade específica máxima;
- c) Fase de crescimento exponencial: a velocidade de crescimento específica atinge seu valor máximo e, conseqüentemente, a reprodução é acelerada;
- d) Fase de desaceleração: nessa fase a velocidade específica de crescimento começa a diminuir devido a concentração limitante de um (ou mais) nutriente (s);
- e) Fase estacionária: essa fase caracteriza-se pela constante concentração de biomassa ao longo do tempo. Nessa fase a densidade celular é mantida, pois as taxas de crescimento e mortalidade celular são iguais;
- f) Fase de declínio: os nutrientes se esgotam e a taxa de mortalidade celular é favorecida.

Todas as fases apresentadas podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Exemplo de curva de crescimento de um cultivo microalgal em um reator descontínuo



Fonte: Adaptado de (AMARAL, 2018).

3.5.3 Colheita da biomassa

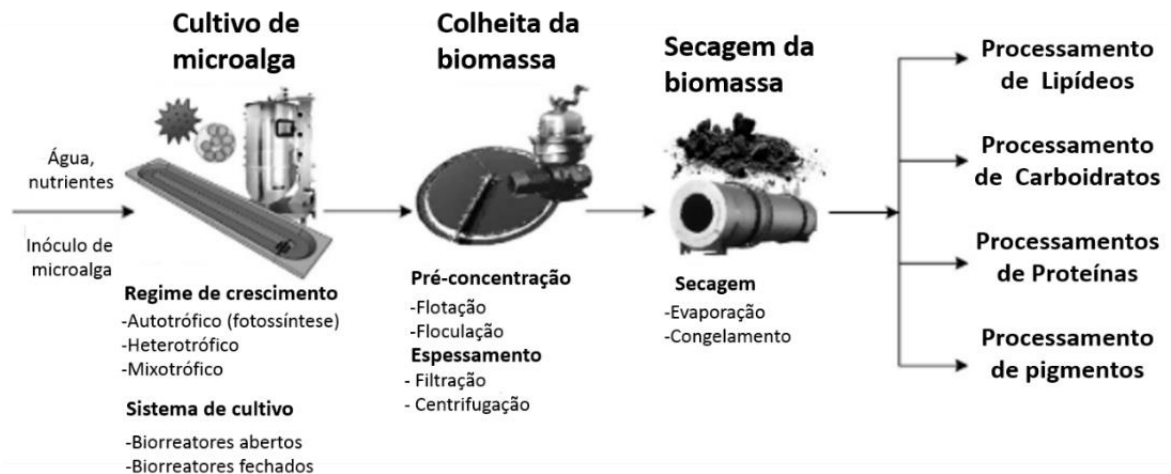
O processo de colheita da biomassa é, para muitos pesquisadores, a etapa principal do cultivo de microalgas. Por serem culturas muito diluídas, a colheita da biomassa exige processos de separação sólido-líquido que possuem altos custos operacionais (RASTOGI et al., 2018b). Os mais conhecidos métodos de colheita de microalgas são: floculação, flotação, filtração, centrifugação, eletrofloculação, sedimentação gravimétrica e biofloculação (AMARAL, 2018).

O Quadro 1 mostra uma comparação entre os métodos de colheita, evidenciando as suas vantagens e desvantagens, enquanto a Figura 8 apresenta esquematicamente o processo de cultivo de microalga, incluindo as etapas de cultivo, colheita e secagem de biomassa, bem como a sua posterior utilização na extração de produtos.

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens de cada processo de colheita de microalgas

Método	Vantagens	Desvantagens
Coagulação Floculação Química	<ul style="list-style-type: none"> Método simples e rápido Baixo custo energético Elevado rendimento de recuperação 	<ul style="list-style-type: none"> Custos elevados dos floculantes Riscos de toxicidade para a biomassa Dificuldade de reutilização do meio de cultivo
Flotação	<ul style="list-style-type: none"> Método de baixo custo Curto período de processo 	<ul style="list-style-type: none"> Difícil implementação para microalgas marinhas
Filtração	<ul style="list-style-type: none"> Eficiência de colheita elevada 	<ul style="list-style-type: none"> Longo período de processo Requer limpezas ou trocas regulares de membranas
Centrifugação	<ul style="list-style-type: none"> Método rápido e eficiente Aplicável a espécies de baixa densidade 	<ul style="list-style-type: none"> Custo elevado Alto consumo energético Riscos de cisalhamento celular
Eletrofloculação	<ul style="list-style-type: none"> Não requer adição de reagentes químicos Aplicável a uma grande variedade de microalgas 	<ul style="list-style-type: none"> Alto custo energético e de equipamentos
Sedimentação	<ul style="list-style-type: none"> Método simples 	<ul style="list-style-type: none"> Riscos de deterioração da biomassa
Biofloculação	<ul style="list-style-type: none"> Não oferece risco de toxicidade para a biomassa Permite a reutilização do meio de cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> Alterações na composição celular

Fonte: Adaptado de (AMARAL, 2018; BARROS et al., 2015).

Figura 8 - Representação esquemática do processo de cultivo de microalgas.

Fonte: (COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

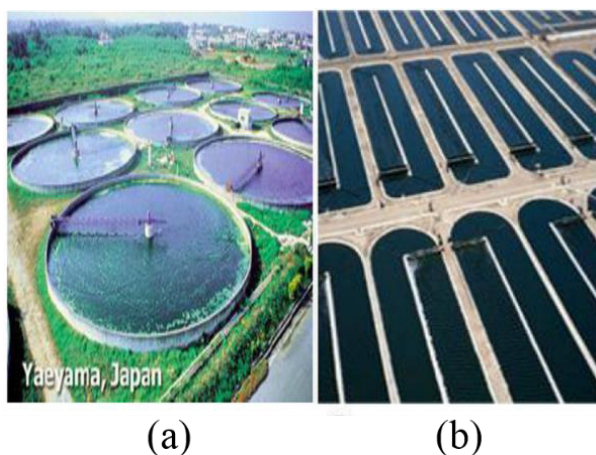
3.6 Biorreatores

Ao se iniciar um cultivo de microalgas, deve-se determinar o tipo de biorreator a ser utilizado. Os cultivos de grande porte que visam a utilização da biomassa para fins comerciais podem ser realizados através de tanques, lagoas ou fotobiorreatores. A escolha pelo biorreator ideal depende de certos fatores como: tipo de iluminação disponível, espaço disponível, volume de trabalho, altura do biorreator, etc (FRANCISCO et al., 2015).

3.6.1 Tanques

Os tanques utilizados para o cultivo de microalgas podem ter o formato circular, retangular, cilíndrico ou elipsoidal e podem conectar-se formando circuitos fechado com recirculação e/ou mistura. A área útil desses tanques é independente pois o principal fator a ser considerado é a profundidade. Sabe-se que a profundidade ideal para esse tipo de sistema de cultivo é de 20 a 30 cm pois grandes profundidades impossibilitam a penetração da luz (POSTEN; SCHAUB, 2009; RAWAT et al., 2013). Outro fator importante de um tanque para a cultura de microalgas é o revestimento interno, que pode ser feito com material plástico, concreto ou até mesmo fibra de vidro, proporcionando uma superfície lisa que auxilie na reflexão da luz, facilite a limpeza e evite o cisalhamento das células com a parede do tanque (BOROWITZKA, 1999). A agitação também pode ser acoplada ao sistema e tem papel essencial na homogeneização do meio de cultivo, proporcionando a iluminação de todas as células (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A Figura 9 apresenta exemplos de reatores do tipo tanque.

Figura 9 - Exemplos de biorreatores do tipo tanque: (a) biorreator circular e (b) *raceway*



Fonte: Adaptado de (AMARAL, 2018; SOARES, 2010).

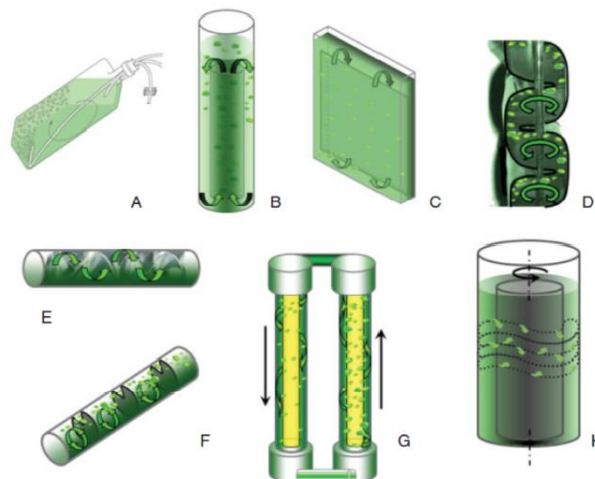
3.6.2 Fotobiorreatores

Os fotobiorreatores são reatores fechados constituídos de material polimérico transparente ou vidro. Na forma de cilindros, os fotobiorreatores são acoplados a bombas de aeração e recirculação e seu diâmetro deve ser dimensionado de modo que haja a iluminação homogênea de todas as células. Assim como os tanques, os fotobiorreatores possuem volumes variáveis e podem ser aplicados em escala laboratorial ou comercial (CHEN et al., 2011; TAGLIAFERRO et al., 2019).

Ao contrário dos tanques, os fotobiorreatores favorecem o controle de pH, iluminação e temperatura, além de reduzir drasticamente os riscos por contaminação e não sofrer variação do no meio de cultivo por condições ambientais (GUIEYSSE; QUIJANO; MUÑOZ, 2011; MORWEISER et al., 2010).

Dentre os fotobiorreatores disponíveis, o tipo coluna de bolhas é amplamente utilizado em pesquisas laboratoriais devido ao seu fácil manuseio, limpeza e versatilidade. Além disso, os fotobiorreatores, apesar do custo de fabricação e operação mais elevado quando construído em escala industrial, apresentam maior produtividade de biomassa e a produção de óleo é significativamente maior (AMARAL, 2018; RASTOGI et al., 2018b). Os diversos tipos de fotobiorreatores podem ser observados na Figura 10 e o Quadro 2 apresenta uma comparação entre os diferentes tipos de biorreatores e as vantagens e desvantagens de cada operação.

Figura 10 - Fotobiorreatores avançados para produção de microalgas: (A) colunas de bolhas inclinado; (B) *Air Lift* de tubos concêntricos; (C) *Air Lift* plano; (D) *Air Lift* tela plana da Subitec; (E) tubular com misturador estático Kunii; (F) tubular com aletas de agitação estática; (G) *Air Lift* com fluxo e geração de redemoinhos; (H) Couette Taylor



Fonte: (OLIVIERI; SALATINO; MARZOCHELLA, 2014).

Quadro 2 - Comparação entre diferentes tipos de biorreatores e suas respectivas vantagens e desvantagens

Biorreator	Vantagens	Desvantagens
Tanques abertos	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente econômico • Fácil de limpar após o cultivo • Ideal para o cultivo que visa à produção de biomassa 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouco controle das condições • Dificuldade em cultivar por longos períodos • Baixa produtividade • Fácil Contaminação
Fotobiorreatores de colunas verticais	<ul style="list-style-type: none"> • Alta transferência de massa • Boa mistura com baixa tensão de cisalhamento • Baixo consumo de energia 	<ul style="list-style-type: none"> • Superfície de iluminação pequena • Tensão de cisalhamento para culturas de algas • Diminuição da área de superfície de iluminação após o aumento de escala
Fotobiorreatores de placa plana	<ul style="list-style-type: none"> • Grande área de superfície de iluminação • Adequado para culturas externas • Boa trajetória de luz • Boa produtividade em biomassa • Relativamente barato • Fácil de limpar 	<ul style="list-style-type: none"> • O aumento de escala requer muitos compartimentos e materiais de suporte • Dificuldade em controlar a temperatura da cultura • Acúmulo de biomassa nas paredes
Fotobiorreatores de colunas	<ul style="list-style-type: none"> • Grande área de superfície de iluminação • Adequado para culturas ao ar livre • Boas produtividades de biomassa • Relativamente barata 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxigênio dissolvido e CO₂ ao longo dos tubos • Incrustação • Algum grau de acúmulo de biomassa nas paredes • Requer um grande espaço

Fonte: Adaptado de (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

3.7 Uso de efluentes no cultivo de microalgas

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 desses 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 (KLINTHONG et al., 2015; QUINTELAS et al., 2008).

Frente a essa problemática, busca-se aliar desenvolvimento econômico com proteção ambiental, intensificando os estudos baseados em processos biológicos para tratamento de efluentes, como a biorremediação. Esse processo apresenta-se como tecnologia promissora e em expansão, com baixo custo e alta eficiência (LIU et al., 2013).

Dentre os micro-organismos utilizados em biorremediação, as microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas envolvendo tratamento de efluentes, em função da sua capacidade de retenção e imobilização de metais (TANGO, 2015). Além disto, a tendência de algumas espécies de microalgas em crescer nos meios ricos em fósforo e nitrogênio faz com que as mesmas sejam utilizadas em tratamento dos efluentes provenientes de esgotos municipais visando à diminuição de matéria orgânica, de compostos fosfatados e nitratos nos sistemas aquáticos. Desse modo, o cultivo das microalgas em efluentes proporciona o crescimento celular da biomassa, dispensando a adição de nutrientes e, desta maneira, tornando o processo mais econômico (EVANS et al., 2017).

Além da utilização de efluentes, o lixiviado proveniente de aterros sanitários também se apresenta como alternativa de meio de cultivo devido à presença de matéria orgânica, metais e demais nutrientes em sua composição (CHEAH et al., 2016; TAGLIAFERRO et al., 2019). O lixiviado é um líquido de odor desagradável, cor escura, com presença de sólidos em suspensão, metais pesados (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , etc), compostos nitrogenados, entre outros, e é resultante do processo de lixiviação de substâncias presentes em resíduos sólidos em aterros sanitários (MAIA et al., 2015; QUEIROZ et al., 2011).

Diversos fatores influenciam na composição biológica e química dos lixiviados provenientes de aterros sanitários, dentre os quais pode-se citar: a forma de operação do aterro, composição química dos resíduos e as condições ambientais que, obviamente, podem variar de acordo com a região do país e as estações do ano (GHOSH; THAKUR; KAUSHIK, 2017), contudo, a composição básica dos lixiviados é composta por quatro grupos de poluentes: metais pesados; matéria orgânica dissolvida; componentes inorgânicos, como por exemplo os cátions Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e os ânions HCO_3^- e Cl^- e componentes orgânicos xenobióticos, representados pelos fenóis e hidrocarbonetos aromáticos (GOMES et al., 2018).

3.8 Reologia

Reologia é a ciência que descreve o comportamento dos fluidos, sob a influência de forças externas. Os fluidos reais apresentam certa resistência ao escoamento ou à deformação, e esta resistência é resultante de uma propriedade denominada viscosidade, introduzida por Issac Newton, em 1887 (SINGH; HELDMAN, 2003).

A lei de Newton afirma que a força por unidade de área (tensão de cisalhamento), necessária para manter o movimento do fluido, é proporcional ao gradiente de velocidade na direção perpendicular ao fluxo (taxa de deformação), e a constante de proporcionalidade

corresponde à viscosidade, que corresponde ao atrito interno, ou seja, medida da resistência ao escoamento (SHARMA; MULVANEY; RIZVI, 2000). A equação que descreve o comportamento destes fluidos é dada por:

$$\sigma = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

em que σ corresponde à tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ à taxa de deformação e μ à viscosidade absoluta. Os fluidos que obedecem ao postulado de Newton, descrito pela equação (1), são chamados de fluidos newtonianos. Para estes fluidos, a viscosidade é independente de $\dot{\gamma}$ ou de σ , dependendo somente da composição e da temperatura (BOGER, 1989)

Os fluidos que não obedecem ao postulado de Newton são designados genericamente de não newtonianos (HOLDSWORTH, 1971). Para os fluidos não newtonianos, a viscosidade é função da taxa de deformação ou da tensão de cisalhamento e por isto, para caracterizá-los, é utilizada a viscosidade aparente (η_a), a uma taxa de deformação específica:

$$\eta_a = \sigma / \dot{\gamma}_i, \text{ onde } \dot{\gamma}_i \text{ é a taxa de deformação na qual se calculou } \eta_a.$$

Os fluidos não newtonianos podem ser classificados como dependentes ou independentes do tempo. A uma temperatura constante, a viscosidade aparente para fluidos não newtonianos independentes do tempo depende somente da tensão de cisalhamento (ou taxa de deformação). O comportamento desses fluidos pode ser dividido em duas categorias: pseudoplásticos e dilatantes. Para os fluidos pseudoplásticos, a viscosidade aparente diminui com a tensão de cisalhamento; estas substâncias geralmente são dispersões de moléculas ou partículas assimétricas, que no repouso apresentam um estado desordenado, mas quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, tendem a orientar-se na direção da força aplicada. Quanto mais elevada a tensão de cisalhamento, maior será a ordenação e, conseqüentemente, menor será a viscosidade aparente (TISCHER, 2006).

O comportamento dilatante é encontrado em suspensões onde a viscosidade aparente aumenta com a tensão de cisalhamento. Uma explicação para este tipo de comportamento é que, à medida que a tensão de cisalhamento aumenta, o líquido intersticial entre as partículas torna-se incapaz de preencher os espaços, devido a um aumento no volume que acompanha o fenômeno, ocorrendo contato direto entre as partículas sólidas, fazendo com que a viscosidade aparente aumente (LEONARDI; CAMPOS, 2001).

Os fluidos também podem apresentar uma tensão inicial a ser vencida antes deles escoarem e este comportamento é usualmente explicado em termos da sua estrutura interna, capaz de impedir o movimento para valores de tensão de cisalhamento menores do que um

valor limite τ_0 . Para τ maior que τ_0 a estrutura interna colapsa, permitindo o escoamento (BOURNE, 2002).

Para os fluidos não newtonianos dependentes do tempo, a viscosidade aparente depende também da duração da tensão aplicada. Esses fluidos são subdivididos em tixotrópicos e reopéticos. No caso do primeiro, a uma taxa de deformação fixa, o fluido torna-se menos viscoso com a duração do cisalhamento, enquanto que para o último observa-se um aumento de viscosidade com o tempo (TISCHER, 2006).

3.9 Fatores que influenciam a reologia

As referências mais recentes relatam como os principais fatores responsáveis pelo comportamento reológico das suspensões a configuração, quantidade, tamanho e distribuição das partículas dispersas; em relação à fase contínua, os fatores que mais influenciam nas propriedades reológicas são a sua composição química, concentração eletrolítica e temperatura (HAMINIUK et al., 2009).

De um modo geral, a formação de sistemas coloidais envolve a degradação de partículas de dimensões maiores ou a agregação de moléculas de íons pequenos. Em ambos os mecanismos, as taxas de agregação e fragmentação são determinadas predominantemente pelo tamanho da partícula e pelo gradiente de velocidades, estimado através da energia dissipada por unidade de massa. A taxa de dissipação de energia é responsável pela frequência de colisão e pela energia de impacto entre as partículas colidindo. Baixas taxas de dissipação de energia promoverão agrupamentos do tipo partícula-partícula, enquanto que a turbulência do fluido provavelmente causará fragmentação dos agregados (MELO; BEL MENEZZI, 2010).

Segundo BOGER (1989) três tipos de forças coexistem nas partículas suspensas em um líquido. Primeiramente, existem as forças de origem coloidal, que se originam das interações entre as partículas: se esta força líquida resultante for atrativa, as partículas tendem a flocular, enquanto que uma repulsão global indica que as partículas permanecerão dispersas. Em segundo lugar, devem ser consideradas as forças de *Brownian*, fortemente dependentes do tamanho das partículas; este tipo de força descreve a distribuição espacial das partículas em uma média de tempo, além de assegurar que as partículas estão em constante movimento. Em terceiro lugar, as forças viscosas que agem sobre as partículas devem ser consideradas; as forças viscosas são proporcionais à diferença entre as velocidades locais das partículas e a do fluido circundante; conseqüentemente, a forma como estas partículas afetam a viscosidade da suspensão está intimamente relacionada à viscosidade da fase contínua.

Nos cultivos microalgais, o comportamento não newtoniano dilatante é geralmente o mais comum; conseqüentemente, a viscosidade destes fluidos não pode ser expressa por um único valor, sendo esta obtida pela tangente em cada ponto do reograma, dependendo da tensão aplicada (LIRA, 2011).

3.10 Planejamento de experimentos

A otimização de qualquer tipo de processo de engenharia provoca inúmeros benefícios para a indústria, principalmente no que tange aos custos de produção. A utilização do planejamento de experimentos é uma excelente opção quando se busca analisar os principais fatores que compõem o produto final de uma empresa (MÄKELÄ, 2017).

O planejamento de experimentos engloba uma coleção de ferramentas capazes de estudar o comportamento de um sistema a partir da realização de um conjunto de experimentos e a verificação dos efeitos de cada uma das variáveis do processo.

A partir dos dados obtidos, determina-se as possíveis incertezas e erros experimentais, gerando um modelo matemático capaz de prever futuros resultados através de mudanças nos parâmetros das variáveis (XIANSHENG et al., 2011)

3.10.1 Metodologia Taguchi

Desenvolvida na década de 1980, a metodologia de Taguchi é baseada na utilização de matrizes ortogonais. O método de Taguchi propicia o aumento da robustez do sistema, ou seja, torna o sistema menos sensível a fatores ruído e determina condições ideais de operação dos fatores de controle (TAGUCHI; RAFANELLI, 1994).

Quando comparado aos demais métodos estatísticos, o método de Taguchi consegue apresentar a melhor condição de ajuste dos fatores, evidenciando ainda, quais deles possuem o maior efeito sobre o sistema e o quão significativo são para o processo.

O Quadro 3 relaciona diversos pesquisadores que se utilizaram dessa poderosa ferramenta para interpretar estatisticamente os fatores que influenciaram no cultivo dos diversos tipos de microalgas, das mais variadas espécies e regiões do mundo.

Quadro 3 - Relação de algumas publicações que utilizaram a metodologia de Taguchi para a interpretação e resultados de cultivos de microalgas.

País	Resumo	Referência
Brasil	Utilização de arranjo ortogonal Taguchi L4 no estudo da conversão de lipídeos em esteres de ácidos graxos.	(AMARAL, 2018)
Brasil	Aplicação de matriz L9 de Taguchi no estudo da biorremediação de lixiviado de aterro sanitário utilizando microalgas.	(REIS et al., 2016)
Índia	Aplicação da metodologia Taguchi na otimização da produtividade lipídica durante a fase heterotrófica.	(CHIRANJEEVI; VENKATA MOHAN, 2016)
Irã	Remoção de metal pesado (cobre) utilizando a microalga <i>Spirulina platensis</i> pelo método de Taguchi.	(BEJARBANEH; BIUKI; MORTAZAVI, 2015)
Irã	Escolha da melhor espécie de microalga e otimização de seu processo de cultivo a partir da aplicação da metodologia de Taguchi.	(RIABI, 2018)

Fonte: Autoria própria.

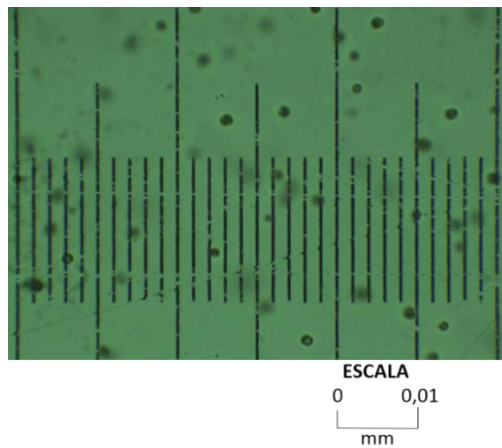
Conforme pode ser verificado no quadro anterior, a metodologia de Taguchi foi utilizada não apenas na etapa inicial de cultivo das microalgas, mas também nas etapas de extração do óleo e posterior transesterificação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécie de microalga utilizada nos experimentos

No presente trabalho utilizou-se a microalga marinha *Chlorella minutissima*, apresentada na Figura 11, oriunda da cidade de Cabo Frio, no estado do Rio de Janeiro, cuja cepa foi gentilmente doada pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

Figura 11 - Imagem da microalga *Chlorella minutissima* retirada em microscópio biológico trinocular (40X).



Fonte: A autoria própria.

A cepa da microalga *Chlorella minutissima* utilizada nesse estudo foi mantida em uma incubadora de madeira dotada de um fotoperíodo, controlada por um temporizador. A intensidade luminosa fornecida é de 15 W por uma lâmpada fluorescente (Figura 12).

Figura 12 - Cultura estoque da microalga *Chlorella minutissima* mantido no cepário do Laboratório de Engenharia de Microalgas da Escola de Engenharia de Lorena.



Fonte: A autoria própria.

A manutenção de um banco de células foi feita a partir da repicagem em erlenmeyers de 125 mL, com fotoperíodo de 12 h:12 h (luz/escuro) e luminosidade média de 4,8 klux. As repicagens foram feitas em períodos de 10 a 15 dias, na proporção de 10 mL de cultura antecessora para 90 mL de meio de cultivo novo, e os frascos foram agitados manualmente uma vez ao dia. Para a manutenção do cultivo mãe, foi utilizado o meio GUILLARD (1975), sendo todos os reagentes utilizados no seu preparo de padrão analítico. As soluções de estoque, utilizadas para preparar o meio de cultivo, foram filtradas através de filtros de 0,22 µm.

4.2 Preparo do inóculo

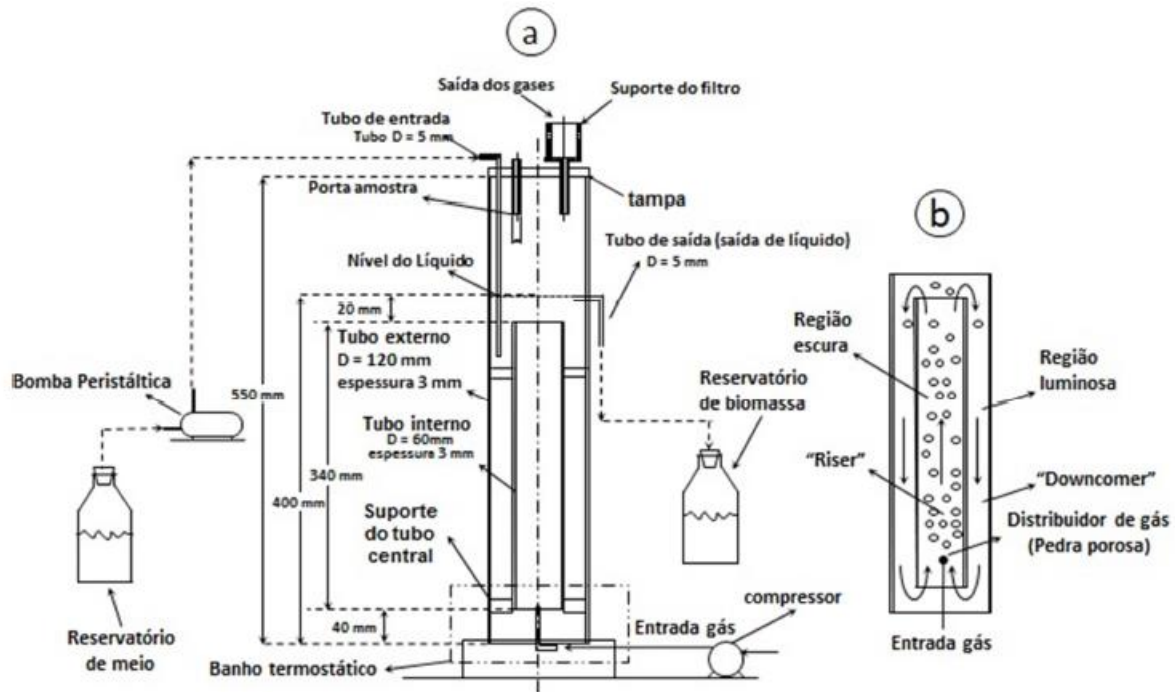
Após o crescimento da cultura estoque, o inóculo passou por um novo repique e foi então adicionado a um recipiente de 2 litros transparente, seguindo as mesmas proporções dos repiques em erlenmeyers. Os recipientes utilizados para o repique foram previamente cloradas e neutralizadas com Tiossulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) para evitar contaminação do inóculo. O crescimento do cultivo foi controlado por meio de leituras de absorbância em espectrofotômetro (UV-Vis, Bel Photonics) e, quando o valor da leitura atingiu a marca de 1,500 (a 680 nm), iniciou-se o cultivo no reator *Air Lift*. O valor de 1,500 para a absorbância foi escolhido devido a necessidade de padronização da concentração celular ao se iniciar os experimentos.

4.3 Meios e condições de cultivo para o crescimento da microalga *Chlorella minutissima*

O crescimento microalgal foi realizado em reator *Air Lift* de bancada a 30°C, com iluminação contínua e volume útil de 4 litros, construído com dimensões proporcionais às descritas por Kaewpintong et al. (2007), conforme pode ser visualizado na Figura 13. Inicialmente, o sistema foi inoculado com 500 mL de cultura estoque de *Chlorella minutissima* preparada como descrito anteriormente.

Os cultivos realizados foram iniciados com o valor de absorbância próximo a 0,300, afim de padronizar a inoculação e evitar possíveis erros no processo. O sistema foi então operado em batelada até que fosse atingida absorbância de 0,75 (a 680 nm). Após o término de todos os ensaios em reator batelada, o cultivo em alimentação semicontínua foi iniciado, com vazões estabelecidas após a determinação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), segundo Franscico et al. (2015).

Figura 13 - Representação esquemática do fotobiorreator *Air Lift* de tubos centrais.



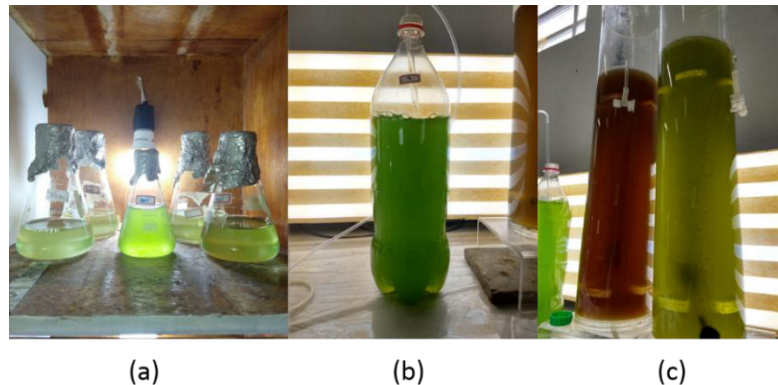
Fonte: (TAGLIAFERRO, 2017).

Os meios de cultivo utilizados foram soluções compostas por água e chorume (lixiviado de aterro sanitário) proveniente do aterro sanitário do município de Cachoeira Paulista. Primeiramente, o chorume foi analisado com relação à Demanda Química de Oxigênio (APHA, 2012) e, uma vez analisado o chorume, os meios de cultivo microalgal foram preparados.

O crescimento microalgal foi acompanhado por análise de absorvância em espectrofotômetro (UV-Vis, Bel Photonics), selecionando o comprimento de onda de 680 nm para a realização das leituras, de acordo com Zhao et al. (2015).

Segundo os autores, tal comprimento de onda quantifica a concentração da clorofila total, o qual é proporcional a biomassa produzida. A temperatura do cultivo foi padronizada em 25°C e o pH foi determinado em intervalos de tempo de 48 horas a partir do início do cultivo. As diferentes etapas de cultivo da *Chlorella minutissima* estão esquematizadas na Figura 14.

Figura 14 - Etapas de cultivo da microalga *Chlorella minutissima*: (a) cultivo em erlenmeyer; (b) cultivo em recipiente transparente; (c) cultivo em reator *Air Lift*



Fonte: Autoria própria.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos dos seguintes fatores: concentração do chorume (5, 10 e 15% v/v), concentração de CO₂ na vazão de aeração (nula, 10 e 15% da vazão), vazão da aeração no reator (0,15; 0,30 e 0,45 vvm) e vazão da corrente de alimentação. Esta última teve seus valores estabelecidos com base no valor da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), empregando-se uma faixa de 50 a 90% de μ_{max} , de modo evitar que ocorra o *Wash Out* (SCHMIDELL et al., 2001).

Ou seja, todos os cultivos realizados foram conduzidos em regime descontínuo até que suas absorvâncias atingissem um valor próximo a 0,75. O valor de absorvância que delimita o fim do cultivo foi padronizado para que pudesse ser efetuado o cálculo da velocidade específica de crescimento (μ) e o valor da vazão de alimentação que foi aplicado nos cultivos em regime semi-contínuo. O valor de absorvância escolhido se localiza no período de crescimento exponencial, portanto, os teores de lipídeos encontrados tendem a ser muito reduzidos quando comparados ao teor médio de lipídeos presente nessa espécie de microalga (JARENKOW, 2014).

Após a realização dos cultivos em batelada e determinação da velocidade específica máxima de crescimento e da vazão de alimentação dos reatores, realizou-se novamente os cultivos das 9 condições experimentais em duplicatas, em regime semi-contínuo, injetando no reator 1/3 do volume diário estipulado em intervalos de tempo de 8 horas. A alimentação dos reatores foi realizada através de uma bomba peristáltica de tensão 12V acoplada a uma fonte de computador. O meio de cultivo alimentado possuía a mesma proporção de lixiviado do cultivo inicial afim de padronizar a carga de nutrientes inserida.

4.4 Planejamento experimental

Uma matriz de Taguchi L₉ foi utilizada para avaliar os efeitos dos fatores anteriormente descritos nas seguintes variáveis resposta: parâmetros reológicos (obtidos após os ajustes dos reogramas aos modelos reológicos) e produtividade em: biomassa, lipídeos, proteínas e açúcares redutores. A Tabela 3 apresenta os fatores e seus parâmetros com os respectivos níveis selecionados.

Tabela 3 - Parâmetros de controle e níveis usados na matriz L₉ de Taguchi.

Código	Fatores	Nível baixo (1)	Nível médio (2)	Nível alto (3)
A	CC (%)	5	10	15
B	CG (%)	0	10	15
C	VA (vvm)	0,15	0,30	0,45
D	Q (vvm)	0,5 μ_{\max}	0,7 μ_{\max}	0,9 μ_{\max}

onde: CC - concentração do chorume; CG – concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA – vazão de aeração; Q – vazão de alimentação.

Fonte: Autoria própria.

As faixas da concentração de CO₂ e da vazão de aeração no reator basearam-se nos trabalhos de Zhao et al. (2015). Estes autores, ao analisarem os efeitos destas variáveis no rendimento em biomassa da *Chlorella minutissima*, cultivada em reatores do tipo colunas de bolhas, relataram que o aumento na concentração de CO₂ (quando esta variou de 10 a 20%), assim como na vazão de aeração (de 0,1 a 0,2 vvm) exerceram efeitos negativos no crescimento microalgal.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ) foi calculada na fase exponencial de crescimento do cultivo de microalga. Para determinar seu valor, plotou-se o gráfico da biomassa seca em escala logarítmica em função do tempo e calculou-se o coeficiente angular da reta formada (WANG et al., 2010). O valor da velocidade específica máxima de crescimento também influenciou no cálculo da vazão de alimentação do reator durante o processo semi-contínuo. Além disso, como pode se observar na Tabela 3, a vazão de alimentação foi calculada a partir de proporções da velocidade específica máxima de crescimento.

Para as análises estatísticas utilizou-se os *softwares* Statistica 13.5 e Minitab 19. A Tabela 4 apresenta o arranjo ortogonal da matriz L₉ de Taguchi, a ser utilizada no reator.

Tabela 4 - Arranjo ortogonal da matriz Taguchi L9 aplicada nesse trabalho.

Ensaio	CC	CG	VA	Q
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Fonte: (TAGUCHI; RAFANELLI, 1994).

4.5 Análises Reológicas

Os ensaios reológicos foram feitos no reômetro Brookfield (modelo LVDV-3T), de maneira automatizada e com temperatura controlada, por meio do *software* Rheocalc e do banho termostático TC-550SD.

Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo utilizada uma nova amostra para cada repetição. Este aparelho mantém uma velocidade de rotação constante que corresponde a certa taxa de deformação, e a tensão de cisalhamento é obtida através da leitura do torque no cilindro de medida (fixo). As leituras foram feitas a cada intervalo de tempo pré-programado e, para cada ponto, foram obtidos dados de taxa de deformação, tensão de cisalhamento, viscosidade e temperatura.

Para a obtenção dos parâmetros reológicos, os reogramas foram ajustados aos modelos reológicos de Casson, Lei da Potência, Bingham e Herschel-Bulkley. Contudo, apenas o modelo Herschel-Bulkley obteve coeficiente de correlação acima de 98% e, por esse motivo, foi o escolhido para adequar as curvas de tensão/deformação. Além disso, o índice de comportamento (n) e o índice de consistência (k), variáveis do modelo matemático e presentes na equação (2), foram avaliados estatisticamente quanto à influência dos fatores.

$$\eta = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

Em que:

η = viscosidade (Pa.s)

τ_0 = limite de escoamento

$\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (s^{-1})

K = índice de consistência (Pa.sⁿ)

n = índice de comportamento (adimensional)

4.6 Controle de crescimento da biomassa microalgal

O crescimento da biomassa microalgal foi controlado a partir da realização de três processos, sendo eles:

a) Determinação da absorbância em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Q898DPT) de uma alíquota de 4 mL retirada de reator: a alíquota foi transferida para uma cubeta de quartzo e sua absorbância determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 680 nm;

b) Determinação do número de células: a estimativa do número de células presentes foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer em que se conta o número de células presentes nos cinco quadrículos principais, sendo 4 deles localizados nas extremidades do quadrado central e o último localizado no centro do quadrado principal. Os APÊNDICES C-K apresentam fotografias do meio celular no primeiro e último dia de cada cultivo realizado em reator semicontínuo;

c) Determinação de biomassa seca: retirou-se diariamente uma alíquota de 2 mL do reator, a qual foi transferida para um tubo de centrífuga. O tubo foi então centrifugado a 1500 RPM por 15 minutos, sendo 1 mL do seu sobrenadante diluído em 4 mL de água destilada para posterior análise de nitrato. O restante do sobrenadante foi descartado e o tubo contendo biomassa foi levado para a estufa a 60°C por 24 horas. Ao término desse período, os tubos foram resfriados em um dessecador, em seguida pesados, onde o valor foi comparado com o da massa do tubo totalmente seco.

4.7 Colheita da Biomassa

A colheita da biomassa iniciou-se com a floculação do cultivo utilizando-se, como agente floculante, o Sulfato de Alumínio 0,15 mol.L⁻¹. Ao término da floculação, a biomassa foi filtrada a vácuo e, durante o processo, a biomassa foi lavada com água destilada, de modo a

retirar parte do sal contido no meio. A biomassa foi então disposta em um vidro de relógio previamente tarado e levada para a estufa a 60°C por 24 horas. Após a secagem, a biomassa foi resfriada em um dessecador e pesada, sendo em seguida calculado o teor de umidade. A biomassa seca foi então macerada e armazenada em um recipiente de vidro.

Contudo, verificou-se que a presença do flocculante afetou algumas análises de produtividade, por esse motivo adotou-se a combinação de métodos de sedimentação e centrifugação a 2000 RPM para a obtenção de biomassa nos cultivos semicontínuos.

4.8 Extração de lipídeos

A extração de lipídeos foi realizada a partir da biomassa seca, baseando-se numa adaptação do processo proposto por BLIGH; DYER (1959), em que foi determinada o teor de umidade de 1 grama de biomassa seca em uma balança infravermelho semi-analítica (Sartorius MA 30). A biomassa foi então disposta em um erlenmeyer de 125 mL e ajustou-se a umidade da mesma acrescentando água destilada até que sua umidade atingisse o valor de 64%, valor esse considerado como ideal a partir da análise de Zorn et al. (2017). Realizado o ajuste de umidade, o Erlenmeyer foi transferido para um banho ultrassônico (Ultronique, Q 3.0) por 15 minutos.

Ao fim desse período, acrescentou-se 9,4 mL de clorofórmio e 10,2 mL de metanol para cada 1g de biomassa utilizada e homogeneizou-se a solução. O sistema foi então reintroduzido no banho de ultrassom de sonda (Hielscher Ultrassound Technology, UP 200S) por mais 35 minutos. Em seguida, foram adicionados mais clorofórmio (na proporção 9,4 mL para cada grama de biomassa) e o erlenmeyer retornou, então, ao ultrassom por mais 35 minutos. Finalizado o processo no ultrassom, acrescentou-se 3,4 mL de água destilada na solução afim de tornar o sistema bifásico e facilitar a remoção dos lipídeos.

O sistema foi então deixado em repouso por 12 horas para a completa separação de fases e, após esse período, a fase apolar foi recolhida em um vidro de amostra previamente seco e pesado. O vidro de amostra foi colocado na estufa a 60°C por 24 horas para a completa evaporação do clorofórmio. Após a secagem, o vidro foi novamente resfriado em dessecador e pesado, obtendo-se assim o rendimento de lipídeos a partir dos cálculos baseados na massa de biomassa utilizada. A equação (3) foi utilizada para a determinação do teor de lipídeos (L%) e, em sequência, utilizou-se a equação (4) para a determinação da produtividade lipídica:

$$L(\%) = \frac{M_{\text{óleo produzida}}}{M_{\text{biomassa utilizada}}} \cdot 100 \quad (3)$$

$$PL(mg. d^{-1}.L^{-1}) = \frac{PB \cdot L\%}{100} \quad (4)$$

em que PB é a produtividade volumétrica em biomassa, calculada a partir da equação (5)

$$PB(mg. d^{-1}.L^{-1}) = \frac{M_{total\ de\ biomassa}}{V_{Reator} \times \Delta t_{dias}} \quad (5)$$

4.9 Determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta

A determinação de nitrogênio total (e, conseqüentemente, da proteína bruta) foi realizada a partir da adaptação do método de Kjeldahl, de acordo com Nogueira et al. (2005). A análise em questão foi realizada em duplicata e o método consistiu na digestão da biomassa seca em blocos digestores utilizando-se de uma curva de aquecimento e posterior neutralização, destilação e titulação com HCl diluído (0,01 mol.L⁻¹).

4.9.1 Preparo da amostra

Em um tubo digestor foi pesado 0,1 gramas de biomassa seca, a qual foram adicionados 2 gramas de mistura catalítica composta por sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro e sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) na proporção de 2:1. A esse tubo foram adicionados também 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. No tubo que representou o branco, a massa de amostra foi substituída por água destilada.

4.9.2 Digestão das amostras

As amostras preparadas foram colocadas em um bloco digestor, sendo aplicada uma rampa de aquecimento de 50°C a 300°C, aumentando a temperatura em 50°C e padronizando um período de 1 hora em cada estágio para a estabilização do equipamento e controle do aquecimento. Após atingir a temperatura de 300°C as amostras permaneceram em aquecimento até que apresentassem uma coloração esverdeada, representando assim, o término da digestão.

4.9.3 Destilação e titulação das amostras

Uma vez digeridas, as amostras passaram para o estágio de destilação. As amostras digeridas foram transferidas para o tubo de destilação e neutralizadas com a adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 40% em massa.

Paralelamente, a solução a ser titulada foi preparada. Tal solução foi composta por 100 mL de solução de Ácido Bórico (H_3BO_3) 2% (em massa), e soluções alcoólicas de vermelho de metila e verde de bromocresol. Em seguida o erlenmeyer foi acoplado ao destilador.

Após a inserção do tudo de destilação no destilador automático, a destilação foi iniciada. Ao término do processo, a solução presente no tubo foi descartada, sendo a solução presente no erlenmeyer titulada com ácido clorídrico $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. O volume medido pela titulação foi então utilizado para a determinação de Nitrogênio Total presente na biomassa. O valor do Nitrogênio Total presente na amostra foi determinado a partir da equação (5):

$$mg \frac{NT}{L} = (V_1 - V_2) \cdot N \cdot F \cdot 14 \cdot 1000 \cdot V_3 \quad (5)$$

Onde: V_1 = Volume gasto na titulação da amostra (mL); V_2 = Volume gasto na titulação do branco (mL); V_3 = Volume da amostra digerida (mL); N = Normalidade do ácido; F = Fator de correção (padronização da solução de ácido sulfúrico 0,02N);

A massa de proteínas obtida foi calculada a partir da multiplicação do valor de nitrogênio total pelo fator de conversão nitrogênio:proteína de 5,75 (GUIMARÃES, LANFER-MARQUEZ, 2005). A equação (6) foi utilizada para a determinação do teor de proteínas (P%) e, em sequência, utilizou-se a equação (7) para a determinação da produtividade em proteínas:

$$P(\%) = \frac{M_{proteinas\ produzida}}{M_{biomassa}} \cdot 100 \quad (6)$$

$$PP(mg \cdot d^{-1} \cdot L^{-1}) = \frac{PB \cdot P\%}{100} \quad (7)$$

em que PB é a produtividade volumétrica em biomassa, calculada a partir da equação (5).

4.10 Determinação do Teor de Cinzas (% C)

A determinação do teor de cinzas foi realizada a partir da adaptação da metodologia proposta por VAN WYCHEN; LAURENS (2013), em que se utiliza a calcinação das amostras em forno mufla. A análise foi realizada em duplicata afim de verificar a presença de desvios e erros durante a pesagem.

A análise iniciou-se com o aquecimento de cadinhos de porcelana vazios e a aplicação de uma rampa de aquecimento de 50°C a 575°C para a total combustão de quaisquer compostos orgânicos presentes nos recipientes. Após atingir a máxima temperatura, os cadinhos permaneceram em aquecimento a 575°C por 4 horas.

Ao término do aquecimento, os cadinhos foram resfriados até atingirem a temperatura ambiente, sendo então pesados em balança analítica (AUW220, Shimadzu). Em seguida, prosseguiu-se com o processo de calcinação das amostras no qual, em cada cadinho, adicionou-se aproximadamente 0,1 gramas de biomassa seca e pesou-se o conjunto (cadinho e biomassa). As amostras foram levadas ao forno mufla e passaram pelo mesmo processo de aquecimento aos quais os cadinhos vazios foram submetidos. Após o término do aquecimento e, uma vez resfriados, os cadinhos foram novamente pesados e a diferença entre a massa do conjunto pós calcinação e a massa do conjunto vazio representa a quantidade de cinzas presente.

A equação (8) foi utilizada para determinar o teor de cinzas:

$$C\% = \frac{M_{conjunto\ pós} - M_{cadinho\ seco}}{M_{biomassa\ inicial}} \quad (8)$$

4.11 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A metodologia para a determinação da DQO das amostras correspondentes ao primeiro e último dias de cultivo foi feita de acordo com Valente, Padilha e Silva (1997).

A DQO é baseada na oxidação de compostos orgânicos na presença de oxidantes fortes em meio ácido. O processo de DQO foi realizado em duas fases sendo a primeira delas representada pela preparação de amostras e a segunda composta pela digestão e análise da absorbância.

4.11.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas a partir da adição de 50 mg Sulfato de Mercúrio (HgSO_4), que nessa análise foi responsável pelo controle da interferência dos íons cloretos em solução. Sabe-se que os íons cloreto provocam interferência positiva na análise e, no caso das amostras a serem analisadas, sua concentração é elevada pois a microalga utilizada no processo (*Chlorella minutissima*) é de origem marinha.

Ao tubo digestor contendo Sulfato de Mercúrio foram adicionados 2,5 mL de Sulfato Ácido de Prata (Ag_2SO_4), (o qual promoveu a acidez do meio), 0,5 mL de Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (o qual atuou como oxidante forte), 0,3 mL de água destilada e 2 mL de

amostra previamente diluída. No presente trabalho, as amostras foram diluídas 20 vezes para que a concentração de íons cloreto fosse a mais adequada e sua interferência, mínima.

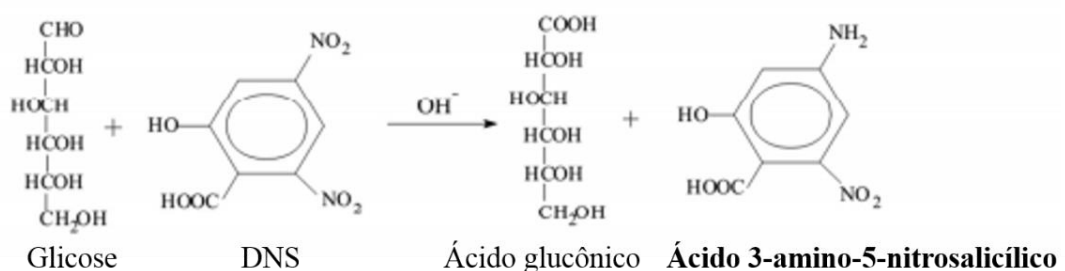
4.11.2 Digestão e análise da absorbância

A digestão das amostras foi realizada em um bloco digestor à temperatura de 150°C durante 1 hora e, após esse período, os tubos foram armazenados em local com baixa luminosidade para o resfriamento. Com os tubos já resfriados, as medidas de absorbância das amostras foram feitas no comprimento de onda de 420 nm, anotando os valores medidos e aplicando em na curva de calibração presente no APÊNDICE A.

4.13 Determinação da produtividade em açúcares redutores por método calorimétrico

O procedimento para a obtenção da quantidade de açúcares redutores baseou-se no método do reagente 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Nesse método, a hidrólise promove a quebra dos polissacarídeos, em presença de ácido, transformando-os monossacarídeos que, por sua vez, reagem com o DNS, cuja coloração original é amarelada, até que se reduza a um ácido de coloração avermelhada (Ácido 2-Amino-5-Nitrosalicílico). Durante a reação, o monossacarídeo redutor é oxidado, conforme pode se observar na Figura 15, e sua concentração óptica, juntamente com o DNS, é determinada com o auxílio de um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm, e uma curva de calibração previamente definida.

Figura 15: Reação calorimétrica entre a glicose e o reagente DNS.



Fonte: (XIA et al., 2015).

4.13.1 Hidrólise da biomassa

O processo de hidrólise das amostras se iniciou com a adição de 300 ± 10 mg de biomassa completamente seca e 3 mL de Ácido Sulfúrico 72%(m/m) em tubos de ensaio. Os tubos foram submetidos a um ultrassom a 30°C durante 60 minutos com agitação por bastão de vidro em intervalos de 10 minutos. Após a etapa do ultrassom, o pré-hidrolisado foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL quantitativamente utilizando 84 mL de água destilada. Os bocais dos erlenmeyers foram cobertos com papel alumínio e todas as amostras foram submetidas a autoclavagem a 120°C por 60 minutos. Ao fim da autoclavagem, as amostras resfriaram até a temperatura ambiente e iniciou-se o processo de filtração. Os conteúdos dos erlenmeyers foram filtrados com o auxílio de uma bomba de vácuo, um kitrassato e cadinhos de Gooch de 30 mL previamente secos e pesados. Os sobrenadantes foram recolhidos em tubos falcon de 50 mL enquanto a biomassa retida nos cadinhos foi submetida à secagem para posterior pesagem e cálculo da massa hidrolisada.

4.13.2 Reação com o DNS

O processo de reação calorimétrica se iniciou com a adição de 1 mL do sobrenadante recolhido da filtração e 3 mL do reagente DNS em tubos de ensaio de 20 mL. Os tubos foram submetidos a um banho termostático a 100°C por 5 minutos e observou-se a mudança de coloração. A preparação do tubo contendo o branco se deu da mesma forma, porém substituiu-se o volume de amostra por 1 mL de água destilada. Ao término do aquecimento, as amostras resfriaram à temperatura ambiente e adicionou-se 16 mL de água destilada em cada tubo de ensaio para realizar a medida de absorbância. Após a medida das absorbâncias, os valores foram submetidos à uma curva de calibração apresentada no APÊNDICE B em que se utilizou do mesmo procedimento, porém substituindo a amostra de biomassa por glicose. A equação (9) foi utilizada para a determinação do teor de açúcares redutores (AR%) e, em sequência, utilizou-se a equação (10) para a determinação da produtividade:

$$AR(\%) = \frac{M_{\text{açúcares produzida}}}{M_{\text{biomassa}}} \cdot 100 \quad (9)$$

$$PAR(mg \cdot d^{-1} \cdot L^{-1}) = \frac{PB \cdot AR\%}{100} \quad (10)$$

em que PB é a produtividade volumétrica em biomassa, calculada a partir da equação (5).

4.14 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir das condições experimentais foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 13.5 para verificar os efeitos dos fatores (CC – Concentração de chorume; CG – Concentração de CO₂ na vazão de aeração e VA – Vazão de aeração) sobre as variáveis respostas (PB = Produtividade em Biomassa, PL = Produtividade em Lipídeos, PP = Produtividade em Proteínas, PAR = Produtividade em Açúcar, n = índice de comportamento e k = índice de consistência) na fase de produção em batelada. Após analisar os dados, o software realizou automaticamente a análise de variância (ANOVA) e o gráfico de efeitos para cada um dos fatores analisados. A análise de variância possibilitou determinar quais fatores foram significativos para o processo (p-valor abaixo de 0,05) e o gráfico de efeitos auxiliou na observação de qual seria o melhor ajuste para a produção de cada uma das variáveis respostas.

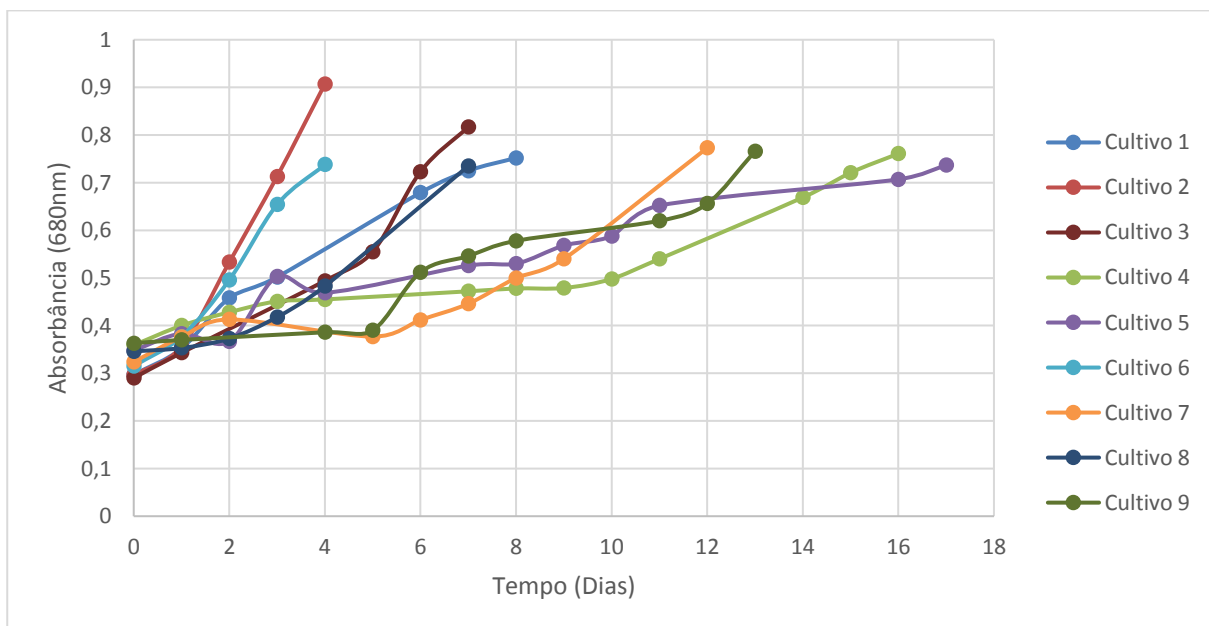
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultados dos cultivos em regime batelada

5.1.1 Avaliação do crescimento celular

Cada experimento realizado teve uma duração específica pois o crescimento microalgal variou de acordo com as condições experimentais. A Figura 16 apresenta os gráficos de absorbância no comprimento de onda de 680 nm em função do tempo de cultivo em dias. Observando os gráficos pode-se deduzir que a variação sofrida pela concentração em cada um dos ensaios está relacionada com a manipulação dos fatores envolvidos no cultivo, afetando-as de maneiras distintas.

Figura 16 - Curvas de crescimento das suspensões de microalgas para cada condição experimental no regime batelada.



Fonte: Autoria própria.

Os cultivos 2 e 6 foram os que atingiram o valor aproximado de 0,75 de absorbância no menor tempo de cultivo em comparação com os demais cultivos. Ambos os cultivos foram inoculados com valores próximos de vazão de gás carbônico (10% e 15% da vazão de aeração, respectivamente) o que significa que a presença de gás carbônico em uma vazão adequada propicia um crescimento acelerado em menor tempo de cultivo. Vale lembrar também que o chorume pode possuir uma toxicidade, representada por sua carga metálica e outros compostos

orgânicos, ocasionando um aumento no tempo de adaptação da microalga ao meio de cultivo, conforme pode ser observado nos demais cultivos. Contudo, a presença de uma elevada carga orgânica possibilita também melhor crescimento celular devido a disponibilidade de nutrientes (CHIU et al., 2015).

5.1.2 Avaliação da composição química celular da microalga

A Tabela 5 apresenta os valores de velocidade específica de crescimento (μ_{\max}), Produtividade de Biomassa (PB), Lipídeos (PL), Proteínas (PP), Açúcares Redutores (PAR) e o respectivo Teor de Cinzas (%C) referente a cada experimento realizado.

Tabela 5 - Resultados referentes aos experimentos realizados em regime batelada.

Experimento	μ_{\max} (d⁻¹)	(PB) (mg L⁻¹ d⁻¹)	(PL) (mg L⁻¹ d⁻¹)	(PP) (mg L⁻¹ d⁻¹)	(PAR) (mg L⁻¹ d⁻¹)	Teor de cinzas (%)
1	0,10	101,69	12,55	71,93	7,91	29,86
2	0,13	78,29	5,19	28,58	6,02	25,88
3	0,26	36,27	1,16	28,34	2,91	21,03
4	0,08	137,90	3,47	53,63	6,49	40,49
5	0,15	62,90	3,40	43,13	4,96	14,00
6	0,47	329,34	16,72	134,45	27,53	22,03
7	0,44	83,52	3,14	44,47	5,67	19,40
8	0,17	291,81	6,77	115,25	15,26	37,59
9	0,08	53,46	1,35	23,23	4,18	25,11

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados presentes na Tabela 5, em comparação com os demais cultivos, o experimento 3 foi o que resultou nas menores produtividades de biomassa, lipídeos e açúcar, além de obter o terceiro menor teor de cinzas. O alto teor de cinzas de alguns experimentos pode ser explicado pela absorção de nutrientes inorgânicos e metais presentes no lixiviado, bem como a presença de alumínio, adicionado durante a etapa de floculação (RICHARDS; MULLINS, 2013).

Ainda de acordo com a Tabela 5, verifica-se que o experimento 6 atingiu o maior valor de produtividade de biomassa dentre todos os experimentos realizados, grande parte desse

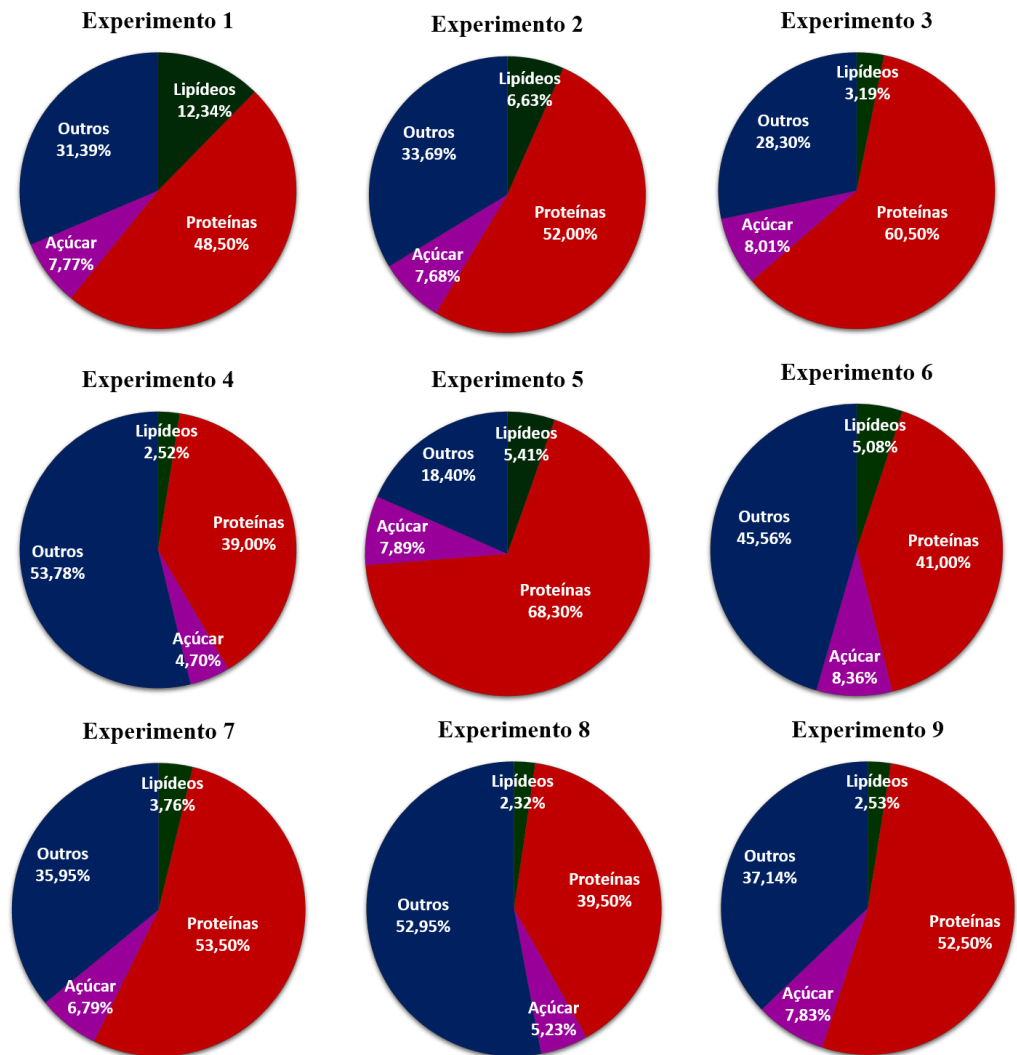
mérito causado pelo nível alto de vazão de gás carbônico e maior porcentagem de chorume, ambos fatores que contribuem para o crescimento celular (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2012). Além disso, essa condição experimental foi a que apresentou a maior Produtividade em Lipídeos (PL), Proteínas (PP) e Açúcares Redutores (PAR), configurando-se assim como a melhor condição experimental na produção dos três componentes.

Analisando ainda a Tabela 5, nota-se que o experimento 8 apresentou a segunda maior produtividade em biomassa, proteínas e açúcares, sendo inferiores apenas aos valores obtidos na condição experimental 6. Ambas condições experimentais, 6 e 8, possuem a mesma vazão de aeração, diferenciando-se na concentração de chorume e vazão de CO₂ na corrente gasosa. Entretanto, considerando-se o chorume como um reagente de mesmo custo entre as duas condições, a condição 8 se apresenta com maior viabilidade para a produção de proteínas, devido à utilização de uma vazão de gás carbônico inferior, o que diminui o custo do processo. Já a condição experimental 6 se destaca como a que possui a melhor condição para a produção de açúcares redutores, já que sua produtividade é 80% maior do que a segunda maior produtividade obtida, representada pela condição 8.

Na condição experimental 7, se obteve o segundo maior valor de velocidade específica de crescimento, o que significa que a condição experimental utilizada favoreceu o crescimento do cultivo de forma mais eficiente.

Um resumo das composições químicas celulares das biomassas produzidas por cada condição experimental foi apresentado na Figura 17. Os gráficos representados na Figura 17 apresentam a porcentagem de cada componente na célula da microalga e a categoria “Outros” engloba o percentual de cinzas e demais componentes da célula que não foram caracterizados, como por exemplo a clorofila e os açúcares não redutores, representados pelos dissacarídeos e os oligossacarídeos.

Figura 17 - Gráficos de composição química celular das biomassas produzidas no regime batelada.



Fonte: Autoria própria.

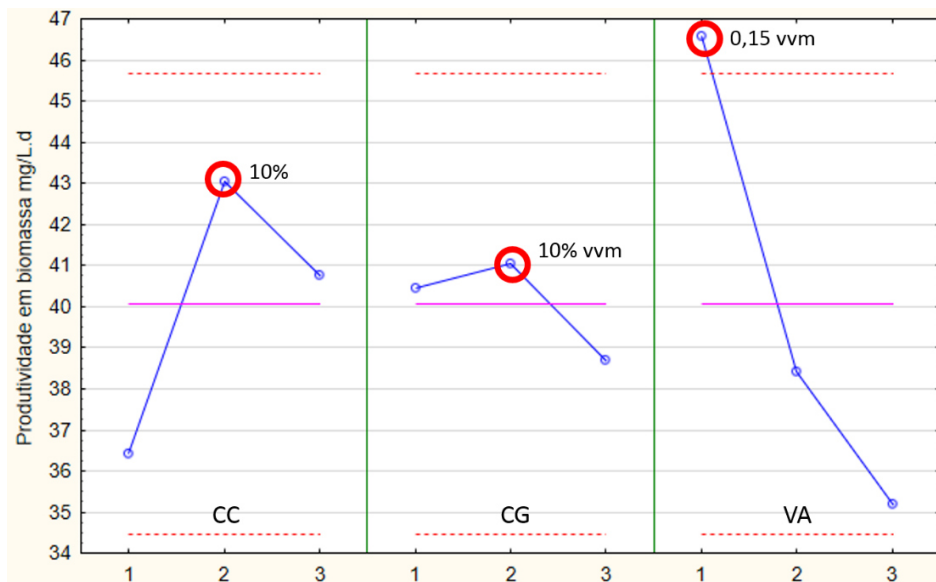
Na Figura 17 pode-se observar que dentre as nove condições experimentais, seis delas atingiram teor de açúcar acima de 7%, o que evidencia um comportamento metabólico celular semelhante em algumas condições de cultivo. Além disso, observa-se também que apesar de possuir maior produtividade, a condição experimental 6 não apresentou o maior teor de lipídeos na biomassa microalgal, sendo essa representada pela condição experimental 1. Tal fato está relacionado com o tempo de cultivo de cada condição experimental, já que a condição experimental 6 se concluiu com um tempo de cultivo 50% inferior à condição experimental 1.

5.1.3 Análise estatística

5.1.3.1 Produtividade em Biomassa (PB)

A Figura 18 apresenta o gráfico de efeitos da variável resposta Produtividade em Biomassa (PB), com relação aos três parâmetros analisados para o cultivo em batelada (concentração de chorume, concentração de gás carbônico na corrente gasosa e vazão de aeração).

Figura 18 – Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em biomassa.



Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do gráfico de efeitos apresentado na Figura 18, pode-se afirmar que os fatores CC (Concentração de Chorume) e VA (Vazão de Aeração) foram os que obtiveram maior influência sobre a variável resposta, sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG (Concentração de CO₂) está ajustado no nível 2 (10% vvm) e o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), a variável resposta tem o seu valor maximizado. Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 1 (5%) e o fator VA está ajustado no nível 3 (0,45 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado, como pode se observar nas condições experimentais 6 (valor maximizado) e 3 (valor minimizado). Além disso, do ponto de vista econômico, a não utilização de CO₂ se apresenta como mais viável, pois esse fator não se mostrou tão influente quando comparado com a concentração de chorume e a vazão de aeração.

Tais afirmações se relacionam com o trabalho desenvolvido por Zhao et al. (2014) em que, durante o cultivo em batelada da microalga *Chlorella pyrenoidosa* (FACHB-9), o maior valor de produtividade em biomassa foi $131,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ na condição experimental utilizando a concentração de chorume em 10%. Contudo, deve-se considerar que se utilizou uma espécie de microalga diferente à utilizada nesse trabalho e em um meio de cultivo cujo lixiviado possuía outra origem.

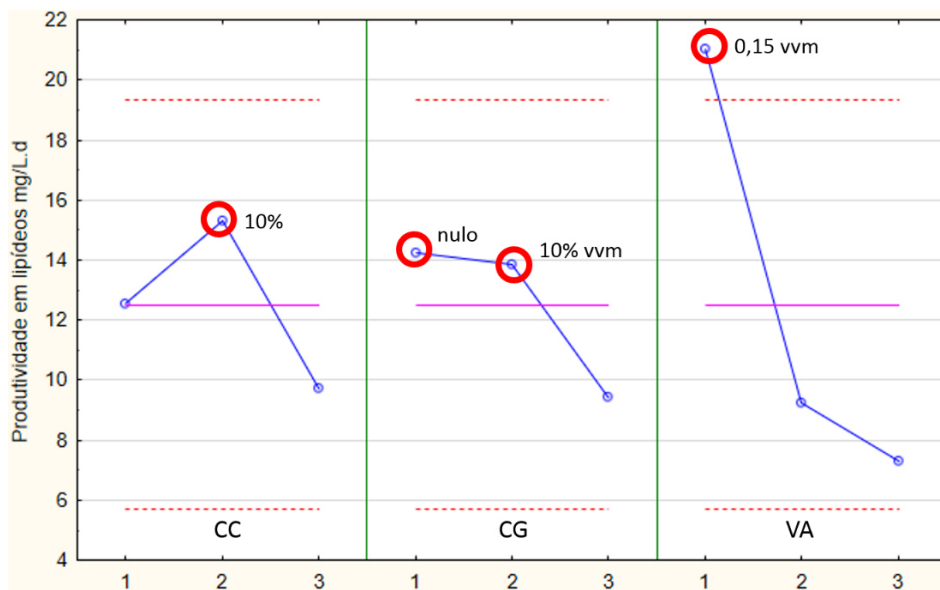
Outros trabalhos também avaliaram o crescimento celular de microalgas em meios de cultivo contendo diluições de lixiviados. Nos trabalhos realizados por Lin et al. (2007) e Sforza et al. (2015), nas condições experimentais que apresentaram a maior concentração celular ao término dos experimentos, a concentração do lixiviado era de 10%, o que justifica esse nível como o mais adequado para a produção de biomassa.

Outra observação que também pode ser feita sobre os efeitos dos fatores é que o fator CG (Concentração de CO_2) possui pouca influência sobre a variável resposta, pois a variação gráfica é sutil e, em ambas as condições, de máxima e mínima produtividade, o nível ajustado do fator CG é o intermediário (10%), o que se justifica pelos resultados obtidos.

5.1.3.2 Produtividade em Lipídeos (PL)

A Figura 19 apresenta o gráfico de efeitos da variável resposta Produtividade em Lipídeos (PL).

Figura 19 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em lipídeos.



Fonte: Autoria própria

A partir da análise do gráfico de efeitos apresentado na Figura 19, pode-se observar que os fatores CC (Concentração de Chorume) e VA (Vazão de Aeração) também obtiveram maior influência sobre a variável resposta, sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%) e o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), a variável resposta tem o seu valor maximizado. Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%) e o fator VA está ajustado no nível 3 (0,45 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Na análise dessa variável resposta, a concentração de gás carbônico se apresenta como um fator com influência mais relevante quando comparada com a influência sobre a produtividade em biomassa. Nesse caso, tanto o nível 1 (nulo), quanto o nível 2 (10%) desse fator se apresentam como alternativas viáveis para a produção lipídica, sendo o nível 1 mais indicado no enfoque da redução de custos.

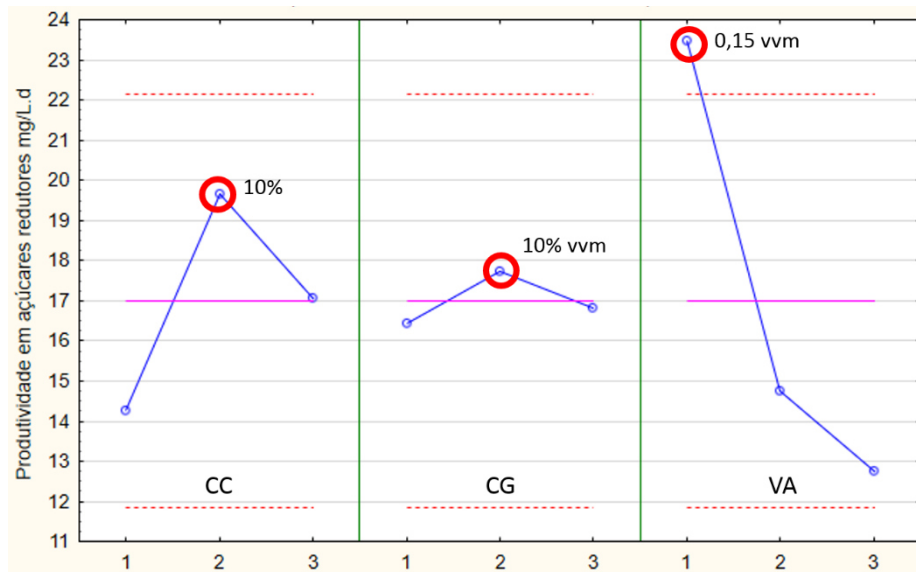
A produtividade em lipídeos obtida durante os cultivos em batelada não foi tão elevada devido ao fato de os cultivos serem encerrados durante a fase exponencial de crescimento, fase essa cujo acúmulo de lipídeos é inferior, como evidenciado por Gatenby et al. (2003). Enquanto o teor máximo de lipídeos obtido nesse trabalho, durante os experimentos em batelada, foi de 12,34% no experimento 1, o trabalho desenvolvido por Zhao et al. (2014), no cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (FACHB-9), obteve teores médios entre 14,5 – 20,8%, utilizando uma diluição de lixiviado de 10% no meio de cultivo, o que indica que esse nível de concentração de chorume contribui na produção lipídica.

Além disso, Tighiri e Erkurt (2019) encontraram um teor em lipídeos de 13,75% em um cultivo misto de microalgas e bactérias, na proporção de 3:1 de inóculo de microalgas, indicando que o valor da produtividade em lipídeos obtida nesse trabalho é semelhante ao encontrado na literatura.

5.1.3.3 Produtividade em Açúcares Redutores (PAR)

A Figura 20 apresenta o gráfico de efeitos da variável resposta Produtividade em Açúcares Redutores (PAR), com relação aos três parâmetros analisados para o cultivo em batelada (concentração de chorume, concentração de gás carbônico na corrente gasosa e vazão de aeração).

Figura 20 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em açúcares redutores.



Fonte: Autoria própria.

Assim como a produtividade em biomassa e em lipídeos, ao se analisar o gráfico de efeitos apresentado na Figura 20, pode-se observar que os fatores CC (Concentração de Chorume) e VA (Vazão de Aeração) também obtiveram maior influência sobre a variável resposta, sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG (Concentração de CO₂) está ajustado no nível 2 (10% vvm) e o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), a variável resposta tem o seu valor maximizado. Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 1 (5%) e o fator VA está ajustado no nível 3 (0,45 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

A produtividade em açúcares é uma informação muito importante quando se trata no desenvolvimento de novas fontes de combustível capazes de suprir a demanda energética. As microalgas, além de possuírem um potencial para a produção de biodiesel, também se apresentam como fontes de carboidrato capazes de produzir bioetanol (DEMIRBAS, 2010; DRAGONE et al., 2010).

Pesquisas como a de Markou, Iconomou e Muylaert (2016) revelaram que em condições de *stress*, como a ausência ou excesso de nutrientes por exemplo, as células de *Arthrospira platensis* foram capazes de duplicar o teor de carboidratos em seu meio celular, atingindo valores de 37,3% a 43,6%, quando, em meio de cultivo adequado, esses valores se alteram entre 10% e 20%.

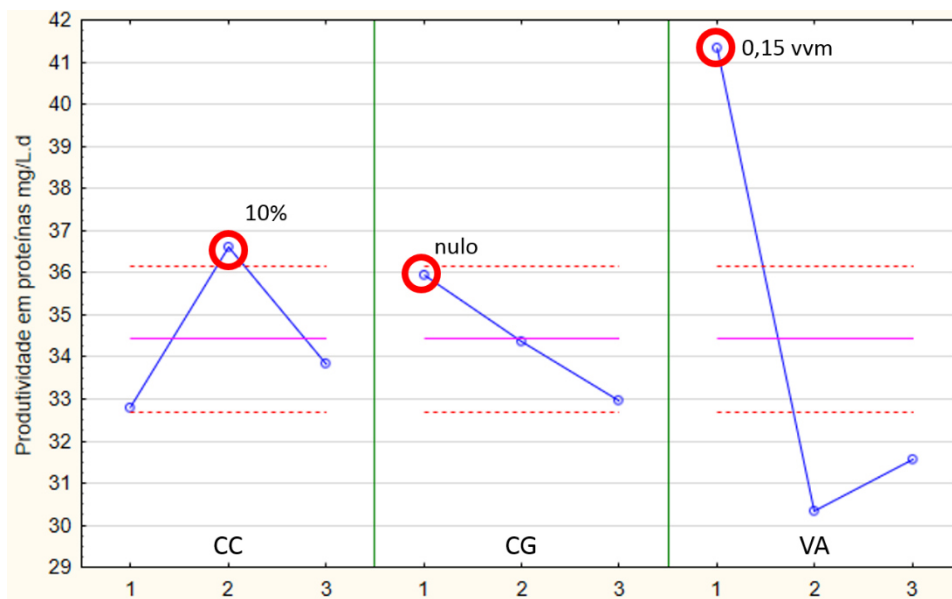
Nessa mesma pesquisa, verificou-se também que as células de *Chlorella vulgaris* mantiveram o teor de carboidratos próximo ao obtido pela cultura de controle, atingindo valores entre 19,6% e 25,8%. A capacidade de alterar o comportamento metabólico da célula de microalga para que seja favorecida a produção de um ou outro componente é de extrema importância.

No trabalho desenvolvido por Hernández-García et al. (2019), após realizar cultivos em batelada das espécies *Desmodesmus spp* e *Scenedesmus obliquus* em quatro diluições de lixiviado municipal (0%, 7%, 10% e 15%), a melhor condição experimental foi submetida à um novo experimento com restrição de nutrientes, como por exemplo, o nitrato. Após a realização dos experimentos com limitação nutricional, observou-se que a *Desmodesmus sp* aumentou seu teor de carboidratos de 15% para 20%, enquanto a *Scenedesmus obliquus* manteve seu teor na faixa de 30%. Tal fato comprova que é possível controlar e influenciar a produtividade de um certo componente de acordo com o interesse comercial.

5.1.3.4 Produtividade em Proteínas (PP)

A Figura 21 apresenta o gráfico de efeitos da variável resposta Produtividade em Proteínas (PP), com relação aos três parâmetros analisados para o cultivo em batelada (concentração de chorume, concentração de gás carbônico na corrente gasosa e vazão de aeração).

Figura 21 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em proteínas.



Fonte: Autoria própria.

Seguindo a mesma tendência das demais produtividades, a produtividade em proteínas também sofreu maior influência dos fatores CC (Concentração de Chorume) e VA (Vazão de Aeração), como pode ser observado na Figura 21. Quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%) e o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), a variável resposta teve o seu valor maximizado. Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 1 (5%) e o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado, corroborando com o resultado obtido na condição experimental 2, em que a produtividade em proteínas foi a terceira menor dentre todas as condições experimentais, superando levemente as condições experimentais 3 e 9. Entretanto, essas duas condições foram submetidas à uma concentração de CO₂ no nível máximo (15%) e, de acordo com o gráfico de efeitos, esse nível influencia negativamente na produtividade proteica, diminuindo seu valor.

O carbono inserido na forma de dióxido de carbono é usado pela microalga na biossíntese de lipídeos e carboidratos, favorecendo ambas produtividades (CHANG et al., 2018).

Dentre os componentes da célula de microalga, as proteínas são as que possuem maior foco de estudo no setor alimentício, pois a biomassa de microalgas pode ser incorporada em diversos processos de produção de alimentos, enriquecendo-os não apenas com proteínas, mas também com carboidratos e fibras, como apresentado por Morais, Miranda e Costa (2006) ao prepararem biscoitos de chocolate utilizando teores de *Spirulina platensis* como ingredientes. Verificou-se que com a adição de *Spirulina platensis*, o teor de proteínas aumentou em 7,7% e o teor máximo de carboidratos atingiu 18,6%.

Assim como os carboidratos, a produção de proteínas pela célula de microalga pode ser influenciada e favorecida mediante mudanças na composição do meio de cultivo. Como por exemplo, Uslu et al. (2011) observaram um aumento do teor de proteínas de 8% a 54% ao modificarem a concentração de nitrogênio no cultivo de *Spirulina platensis*. Da mesma forma, González-Delgado, Barajas-Solano e Ardila-Álvarez (2017) obtiveram um teor de proteínas de 60% no cultivo de *Chlorella vulgaris*, suplementado com acetato de sódio, o que demonstra uma capacidade de produção desse componente celular de maneira a agregar valor em produtos comerciais.

5.1.4 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Os valores das DQOs no primeiro e último dia de cada cultivo, e a respectiva redução percentual, estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Redução da Demanda Química de Oxigênio proporcionada por cada experimento no regime batelada.

Experimento	DQO (mg O₂.L⁻¹)	DQO (mg O₂.L⁻¹)	Redução obtida (%)
1	7,404	5,276	29
2	6,654	5,235	21
3	6,829	2,577	62
4	7,402	3,660	51
5	8,848	5,553	37
6	8,417	2,395	72
7	7,264	7,021	3
8	7,910	5,110	35
9	7,629	5,700	25

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise da Tabela 6 pode-se verificar que o experimento 6 foi o que proporcionou a melhor redução de DQO, na faixa de 72%. O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), a partir da resolução nº 430/2011, não estabelece valores máximos de DQO necessários para o descarte em corpos receptores. Os padrões estabelecidos pelo CONAMA referem-se à concentração máxima de metais pesados nos resíduos e um valor mínimo de redução de DBO₅ de 60% (CONAMA, 2011).

Com exceção da condição experimental 7, as demais condições apresentaram uma redução da DQO acima de 20%. Obviamente busca-se tratar o lixiviado da forma mais eficaz possível, contudo algumas condições experimentais não propiciam a decomposição da matéria orgânica de forma tão significativa.

No trabalho desenvolvido por Markou, Iconomou e Muylaert (2016), os cultivos de *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris*, em meios de cultivos contendo diluições de lixiviado, apresentaram comportamentos distintos quanto à redução da DQO. Enquanto os cultivos de *Arthrospira platensis* tiveram baixas reduções e até mesmo aumento da DQO, os

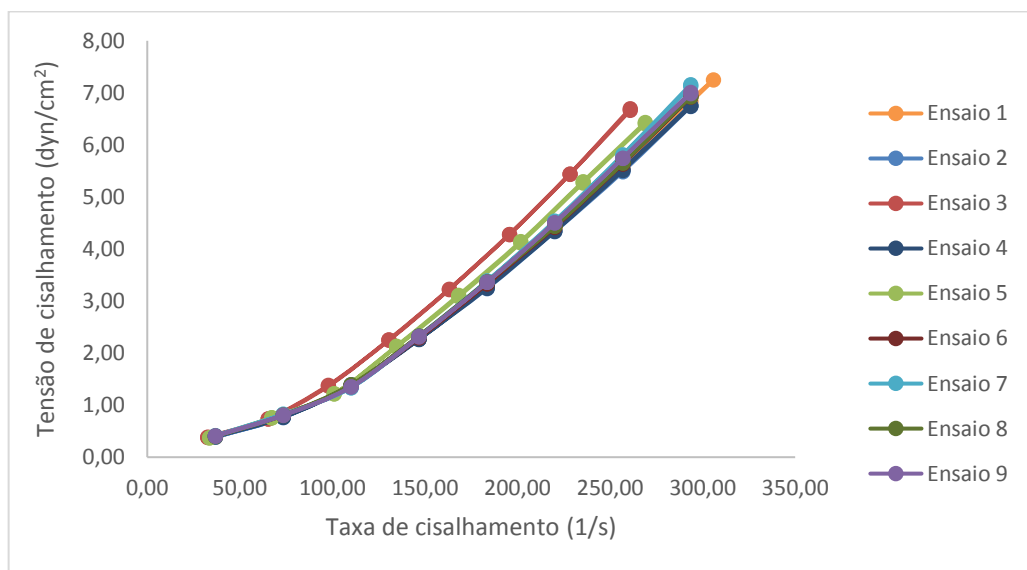
cultivos de *Chlorella vulgaris* obtiveram reduções entre 45% e 82%, o que indica que a escolha da espécie de microalga para o tratamento de efluentes deve ser feita cuidadosamente.

Além disso, a utilização de microalgas do gênero *Chlorella* também se mostrou eficaz na diminuição da DQO na pesquisa desenvolvida por Nair, Senthilnathan e Nagendra (2019), em que o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* possibilitou a redução de 74% na DQO, 91% na DBO e 95% em nitrogênio amoniacal e fosfatos.

5.1.5 Análises reológicas

As análises reológicas foram baseadas na obtenção de curvas de tensão-deformação das culturas de microalga cultivadas em reator *Air Lift*. A Figura 22 apresenta os reogramas de cada um dos experimentos realizados.

Figura 22 - Representação do comportamento reológico de cada experimento realizado.



Fonte: Autoria Própria.

Ao avaliar os reogramas de cada cultivo de microalga realizado, pode-se afirmar que o cultivo de microalgas apresenta comportamento de um fluido não-Newtoniano, mais especificamente um líquido que apresenta um comportamento de fluxo dilatante. Esse tipo de fluido é caracterizado pela dependência entre a viscosidade e a tensão de cisalhamento, no qual o valor da viscosidade aumenta a partir do aumento da taxa de cisalhamento. Esse tipo de comportamento pode ser encontrado, por exemplo, em emulsões que possuem elevada concentração de partículas sólidas como é o caso dos cultivos de microalgas (HOLDSWORTH, 1971).

Na pesquisa desenvolvida por Chen et al. (1997), a suspensão da microalga *Haematococcus lacustres* apresentou comportamento não-Newtoniano tanto no cultivo mixotrófico quanto heterotrófico durante o seu crescimento. Outro estudo realizado em Pequim, na China, por Chou et al. (2013) determinou o comportamento reológico da suspensão de *Chlorella sp* durante as fases de cultivo e observou-se que durante a fase de menor concentração celular, a suspensão comportou-se como um fluido Newtoniano e, conforme o aumento da concentração, o comportamento se alterou para o de fluido não-Newtoniano, também identificado nesse trabalho.

5.1.5.1 Ajuste de modelos matemáticos ao comportamento reológico do cultivo de microalgas

Durante a análise de reologia aplicou-se quatro modelos matemáticos diferentes com o intuito de determinar qual deles possuía maior correlação com o comportamento apresentado pelo cultivo de microalgas. Os modelos matemáticos aplicados foram Bingham, Casson, Lei de Potência e Herschel-Bulkley, sendo esse último o que obteve coeficiente de correlação próximo a 1,0, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Ajuste do modelo matemático Herschel-Bulkley ao comportamento reológico apresentado pelo cultivo de microalgas no regime batelada.

Experimento	K (cP)	n	τ^0 (dyn/cm²)	Confiança do ajuste (%)
1	0,072	1,610	0,080	99,92
2	0,075	1,601	0,080	99,93
3	0,070	1,611	0,082	99,95
4	0,069	1,610	0,094	99,93
5	0,057	1,658	0,115	99,90
6	0,061	1,643	0,120	99,90
7	0,057	1,659	0,103	99,89
8	0,068	1,626	0,102	99,90
9	0,057	1,659	0,115	99,91

Onde: K – Índice de consistência; n – Índice de comportamento e τ^0 – Tensão limite de escoamento;
Fonte: Autoria própria.

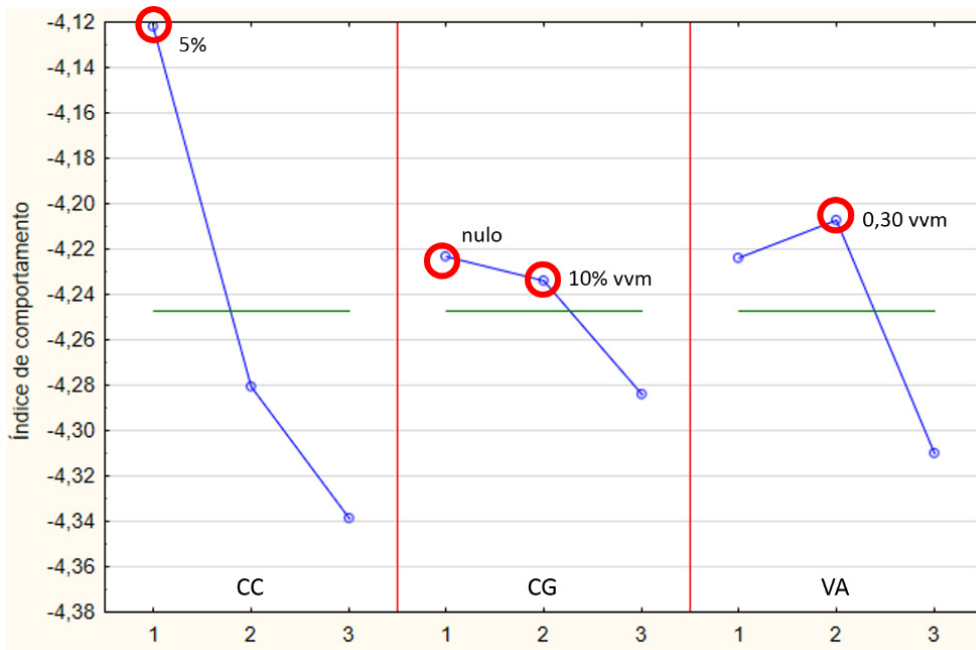
Como pode ser observado, o modelo matemático Herschel-Bulkley atingiu uma confiança do ajuste ao comportamento reológico acima de 99,8% em todos os experimentos realizados, o que justifica a característica dos cultivos como fluidos não-Newtonianos. Os demais modelos matemáticos obtiveram confiança de ajuste entre 74-93% e, por esse motivo, não foram analisados com maior profundidade.

O modelo matemático de Herschel-Bulkley é o mais completo em comparação aos demais modelos aplicados porque sua equação engloba três parâmetros: O limite de escoamento τ^0 é extrapolado através do gráfico de tensão cisalhante (τ) versus taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$); o índice de consistência, K, representa o grau de resistência do fluido ao escoamento natural, e o índice de comportamento, n, apresenta o afastamento do fluido ao modelo Newtoniano, em outras palavras, quanto mais próximo de 1, mais próximo do comportamento de um fluido Newtoniano ele está (ZHU; KIM; DE KEE, 2005).

5.1.5.2 Análise estatística dos índices de comportamento (n) e consistência (k)

Além de se avaliar o tipo de comportamento reológico das suspensões de microalgas e verificar que o mesmo se adequa ao comportamento de um fluido dilatante, fez-se necessário avaliar se algum dos fatores aplicados no processo obteve qualquer influência sobre essas duas variáveis respostas. Contudo, ao contrário da análise feita para as produtividades em biomassa, lipídeos, açúcares redutores e proteínas, a análise estatística para ambos os índices buscou o ajuste que minimize o valor de ambos, de maneira a aproximar o comportamento da suspensão de microalgas ao de um fluido Newtoniano.

As Figuras 23 e 24 apresentam, respectivamente, os gráficos de efeitos da variável resposta n (índice de comportamento) e K (índice de consistência), com relação aos três parâmetros analisados para o cultivo em batelada (concentração de chorume, concentração de gás carbônico na corrente gasosa e vazão de aeração).

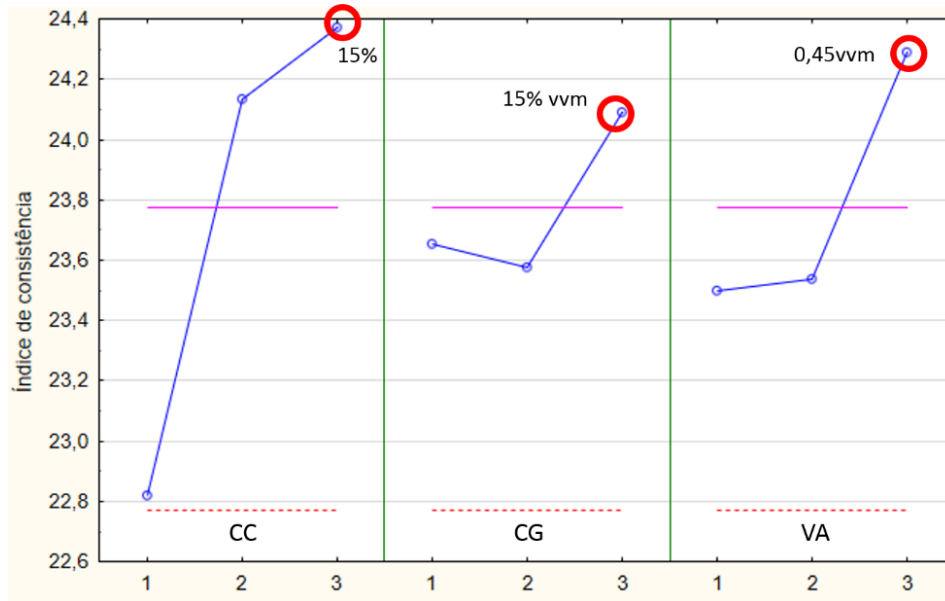
Figura 23 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de comportamento (n).

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do gráfico de efeitos apresentado na Figura 23, pode-se afirmar que os fatores CC (Concentração de Chorume) e VA (Vazão de Aeração) foram os que obtiveram maior influência sobre a variável resposta (n), sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 1 (5%), o fator CG está ajustado nos níveis 1 (nulo) ou 2 (10% vvm) e o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado, o que justifica o resultado obtido na condição experimental 2.

Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%) e o fator VA está ajustado no nível 3 (0,45 vvm), a variável resposta tem o seu valor maximizado, corroborando com os resultados obtidos nas condições 7 e 9, ambas as condições possuem alta concentração de chorume e valores de aeração elevados, aumentando a concentração celular e consequente deposição de células.

Figura 24 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de consistência (k).



Fonte: Autoria própria.

Conforme pode se observar na Figura 24, todos os fatores tiveram influência considerável sobre a variável resposta, sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado no nível 3 (15% vvm) e o fator VA também está ajustado no nível 3 (0,45 vvm), a variável resposta tem o seu valor minimizado, o que justifica o resultado obtido na condição experimental 9. Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 1 (5%), o fator CG está ajustado no nível 2 (10% vvm) e o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), a variável resposta tem o seu valor maximizado, corroborando com os resultados obtidos nas condições 1 e 2, ambas as condições possuem dois fatores que se adequam ao melhor ajuste proposto.

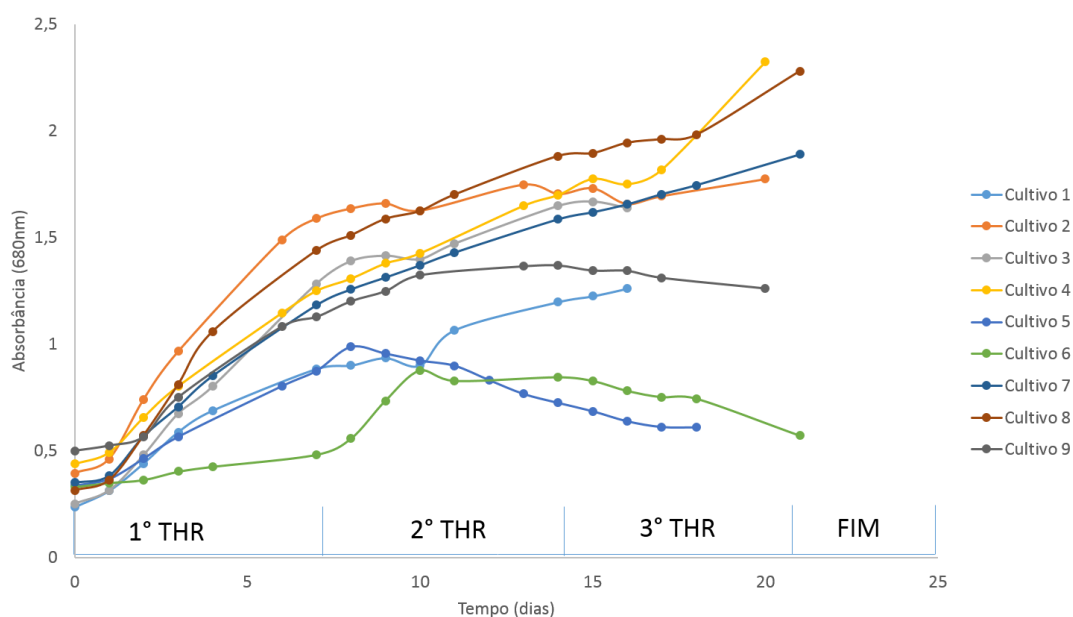
Os resultados apresentados estão de acordo com as investigações recentes, cujos resultados apontam a natureza não-Newtoniana para a maioria dos cultivos microalgais com elevada concentração celular mostrando, ocasionalmente, uma resistência inicial ao fluxo e/ou uma dependência com o tempo (LIRA, 2011; ADESANYA; VADILLO; MACKLEY, 2012; WILEMAN; OZKAN; BERBEROGLU, 2012; PELEGRINE et al., 2016).

5.2 Resultados dos cultivos em regime semi-contínuo

5.2.1 Avaliação do crescimento celular

A Figura 25 apresenta os gráficos de absorvância em função do tempo de cultivo em dias.

Figura 25 - Curvas de crescimento das suspensões de microalgas no regime semi-contínuo.



Fonte: Autoria própria.

Observando os gráficos pode-se deduzir que a variação sofrida pela concentração em cada um dos ensaios está relacionada com a manipulação dos fatores envolvidos no cultivo, afetando-as de maneiras distintas. Maiores valores de absorvância, ao final do cultivo, foram obtidos para níveis elevados na concentração de chorume, da fonte de carbono e vazões de aeração.

Com relação ao efeito da concentração do chorume no meio de cultivo, Khalili et al. (2014) afirmam que a tendência de algumas espécies de microalgas em crescer nos meios ricos em fósforo e nitrogênio faz com que as mesmas sejam utilizadas em tratamento dos efluentes provenientes de esgotos municipais visando à diminuição de matéria orgânica, de compostos fosfatados e nitratos nos sistemas aquáticos. Desse modo, o cultivo das microalgas em efluentes proporciona o crescimento celular da biomassa, dispensando a adição de nutrientes e, desta maneira, tornando o processo mais econômico. Os autores afirmam que a concentração destes

nutrientes no meio é diretamente proporcional à taxa de crescimento celular das algas, exceto em soluções com concentração acima do nível crítico.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles obtidos por Tagliaferro (2017). De acordo com as observações do autor, o lixiviado proveniente de aterros sanitários pode ser utilizado como meio de cultivo, visto que o mesmo contém vários nutrientes que podem ser aproveitados pelas microalgas, tais como os metais, os sais dissolvidos e substâncias orgânicas, sendo que estas últimas podem ser degradadas mais rapidamente graças ao oxigênio produzido na fotossíntese, durante o crescimento microalgal (CHEAH et al., 2016). No entanto, a diluição do lixiviado faz-se necessária devido à elevada concentração de seus componentes, alguns dos quais tóxicos para o crescimento da microalga.

5.2.2 Avaliação da composição química celular da microalga

Após a realização dos cultivos em batelada, verificou-se a necessidade de se alterar o sistema de colheita da biomassa microalgal. A presença do flocculante Sulfato de Alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) impactou diretamente nos teores de cinzas e lipídeos, por esse motivo utilizou-se da sedimentação e centrifugação para realizar a colheita da biomassa.

A célula de microalga é composta em sua maior parte por lipídeos, proteínas, carboidratos e cinzas. A Tabela 8 apresenta os valores da Produtividade de Biomassa (PB), Lipídeos (PL), Proteínas (PP), Açúcares Redutores (AR) e o respectivo Teor de Cinzas (%C) referente a cada experimento realizado. As análises foram realizadas em duplicatas e o valor apresentado refere-se a média dos valores apresentados por cada amostra.

Tabela 8 - Resultados referentes aos experimentos realizados em regime semi-contínuo.

Experimento	(PB) (mg L⁻¹ d⁻¹)	(PL) (mg L⁻¹ d⁻¹)	(PP) (mg L⁻¹ d⁻¹)	(PAR) (mg L⁻¹ d⁻¹)	Teor de cinzas (%)
1	77,9±12,7	5,58±5,10	47,36±46,32	3,77±0,54	31,52±14,49
2	64,5±1,4	11,2±2,45	54,55±1,41	3,88±0,11	15,88±3,19
3	74,7±31,4	4,84±0,10	55,16±23,24	2,82±1,52	12,9±1,12
4	56,8±5,2	9,13±0,65	43,26±1,69	3,60±0,03	7,92±1,38
5	87,7±1,8	2,22±0,39	13,59±3,19	8,02±4,25	27,45±3,59
6	70,1±13,8	2,38±1,7	9,49±7,47	9,57±4,83	37,57±2,66
7	52,0±1,5	9,07±0,15	40,67±21,25	2,54±0,29	11,21±13,49
8	60,2±9,3	9,15±0,88	50,03±42,53	3,05±0,13	11,30±0,29
9	58,5±22,7	5,79±0,20	47,29±39,58	2,21±1,40	20,82±0,86

Fonte: Autoria própria.

A condição experimental 1 foi a que apresentou o segundo maior teor de cinzas dentre todas as condições experimentais. Em comparação com o cultivo realizado em batelada, na mesma condição experimental, a produtividade em biomassa foi 23,4% menor. O mesmo aconteceu com as produtividades em lipídeos, proteínas e açúcares, com reduções de 55,5%, 53,9% e 47,7% respectivamente. Tais reduções indicam que o regime semi-contínuo não contribuiu para o crescimento dos teores dos principais produtos de interesse da biomassa de microalgas, nessas condições.

Na condição experimental 2, quando comparado com o regime em batelada, a produtividade em biomassa reduziu 17,6% enquanto a produtividade em lipídeos e proteínas aumentaram 115% e 91%, indicando que para esses dois componentes, o sistema semi-contínuo é o mais adequado. Inclusive, essa condição experimental foi a que obteve a maior produtividade em lipídeos. Contudo, a produtividade em açúcares reduziu em 35,5%, muito provavelmente afetada pelo aumento do teor dos demais componentes.

A condição experimental 3 obteve produtividade total em biomassa 106% maior que a produtividade obtida no cultivo em batelada. Assim como a produtividade em biomassa, as produtividades em lipídeos e proteínas também tiveram seus valores aumentados, 317% e 94% respectivamente. Nessa condição experimental, a produtividade em açúcares se manteve praticamente constante, reduzindo-se em apenas 3%.

Na condição experimental 4, apesar da redução em cerca de 59% na produtividade em biomassa, tal condição experimental obteve um aumento significativo na produtividade em

lipídeos (163%). Assim como a condição experimental 2, a produtividade em açúcares teve seu valor reduzido mediante o aumento das demais produtividades (na faixa de 44%).

No experimento 5, a produtividade total em biomassa foi de 39,4% maior que o experimento realizado em regime batelada. No entanto, o aumento da produtividade em biomassa não se repetiu na composição celular, pois as produtividades em lipídeos e proteínas reduziram em 35% e 69% respectivamente e, devido a redução em suas produtividades, a produtividade em açúcares teve seu valor aumentado em 62%.

Dentre todas as condições experimentais, a condição número 6 foi a que obteve redução em todos os valores de produtividade, apresentando-se assim como a condição experimental cujo regime semi-contínuo é o menos eficiente, contrapondo totalmente os resultados obtidos durante o experimento em regime batelada. As respectivas reduções de produtividade em biomassa, lipídeos, proteínas e açúcares foram, respectivamente: 73,4%, 86,7%, 93% e 71%.

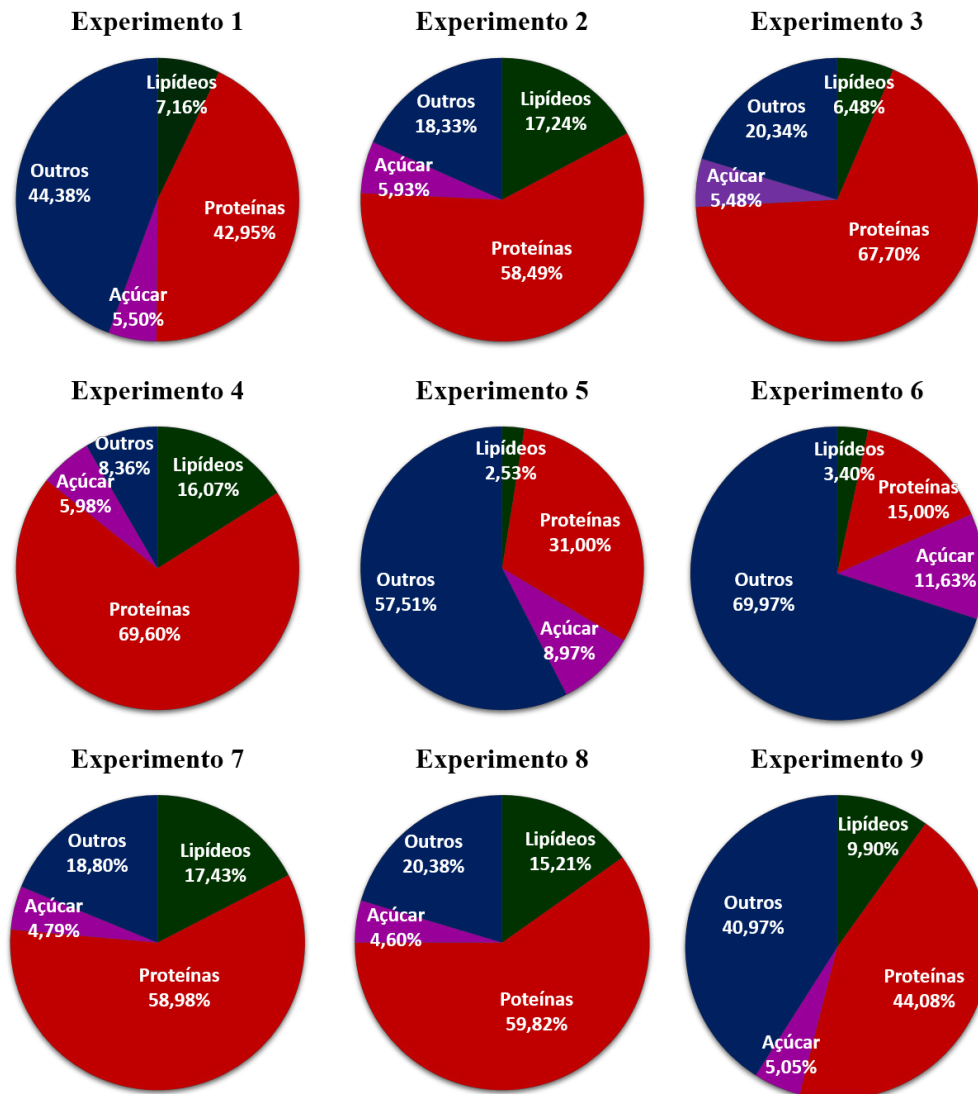
Na condição experimental 7, a produtividade total em biomassa, quando comparada com o regime em batelada, foi 37,7% menor, contudo, a produtividade em lipídeos dobrou, atingindo valor médio de 9,07 mg L⁻¹ d⁻¹. Devido ao aumento considerável da produtividade em lipídeos e a leve redução da produtividade em proteínas (8,5%), a produtividade em açúcares reduziu em 55%, seguindo a mesma tendência dos cultivos anteriores.

No experimento 8, a produtividade total em biomassa foi cerca de 80% menor que a produtividade obtida no regime batelada, porém essa condição experimental também obteve aumento de 34% em sua produtividade em lipídeos e redução significativa de 83% na produtividade em açúcares.

Na condição experimental 9, a produtividade total de biomassa representou um aumento de apenas 9% em relação ao experimento conduzido no regime em batelada. Em comparação com a biomassa, o aumento na produtividade em lipídeos foi mais significativo, obtendo valores três vezes maiores. A produtividade em açúcares, assim como os demais cultivos que obtiveram aumento de produtividade em lipídeos, teve seu valor reduzido em 47%.

Assim como nos cultivos em batelada, também se determinou graficamente as composições químicas das células de microalga em cada condição experimental, apresentado na Figura 26. Como pode se observar, em algumas condições experimentais, a categoria “Outros” apresentou valores superiores ao que é considerável satisfatório.

Figura 26 - Gráficos de composição celular das suspensões de microalgas no regime semicontínuo.

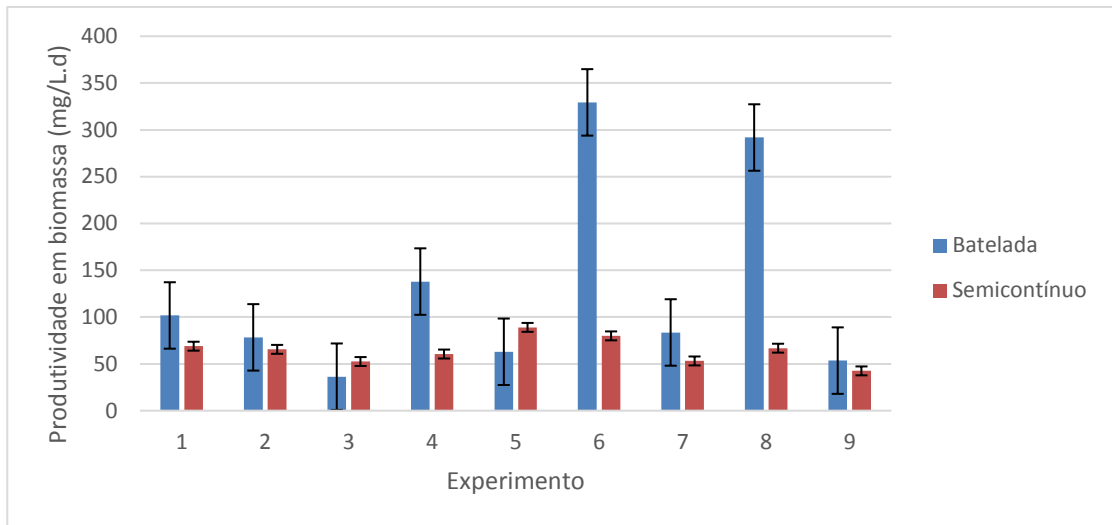


Fonte: Autoria própria.

Sabe-se que o teor de cinzas se refere diretamente aos sais minerais e demais componentes cuja temperatura de ebulição é muito elevada, como é o caso dos metais, e seu valor deve se estabelecer entre 1 a 10%, como aqueles encontrados por Tagliaferro (2017). O valor acima do normal pode estar relacionado com a alta carga metálica presente no chorume e ao fato de não haver tratamento do efluente eficaz devido a alimentação contínua de meio de cultivo.

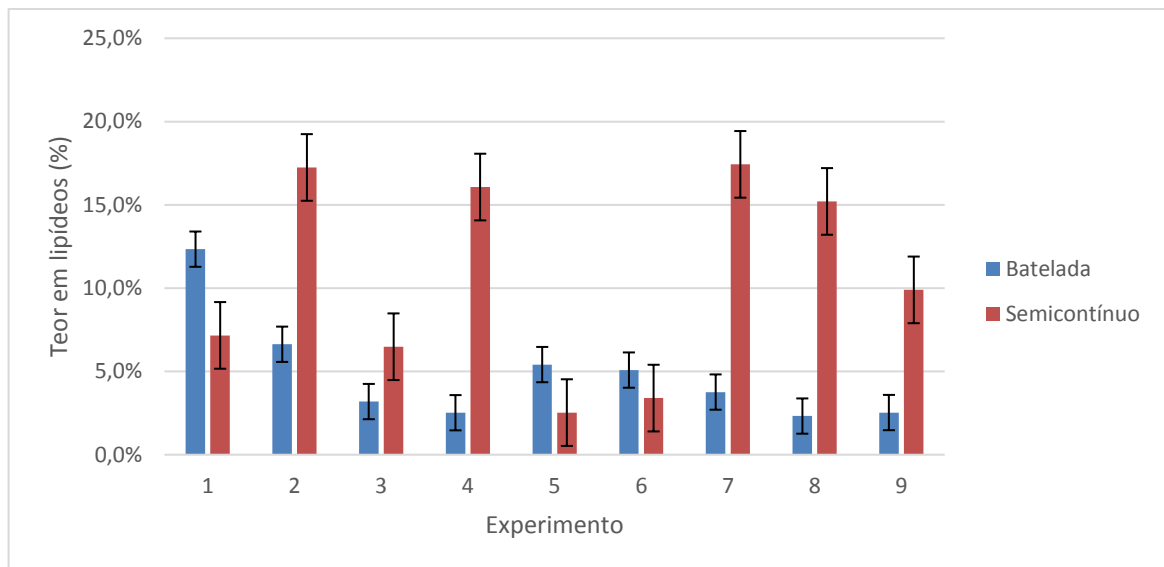
De modo geral, a aplicação do regime semi-contínuo possibilitou observar que, apesar da produtividade em biomassa diminuir na maioria das condições experimentais, a composição química das células obteve grandes aumentos nos teores de lipídeos e proteínas, conforme apresentado nas Figuras 27, 28, 29 e 30.

Figura 27 - Comparação da produtividade média em biomassa em ambos regimes de cultivo.



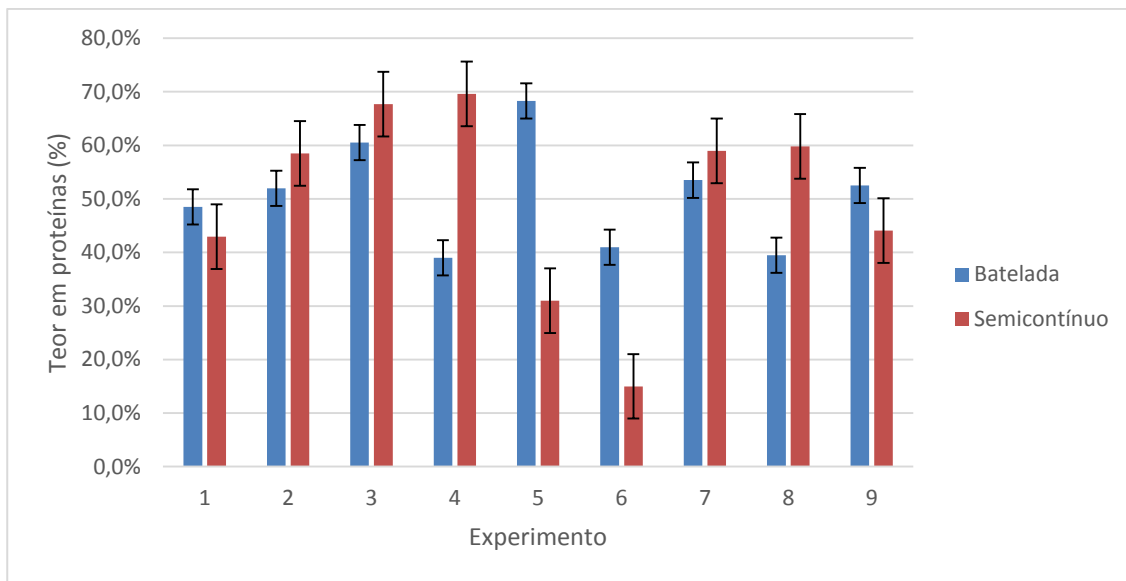
Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Comparação do teor médio em lipídeos em ambos regimes de cultivo.



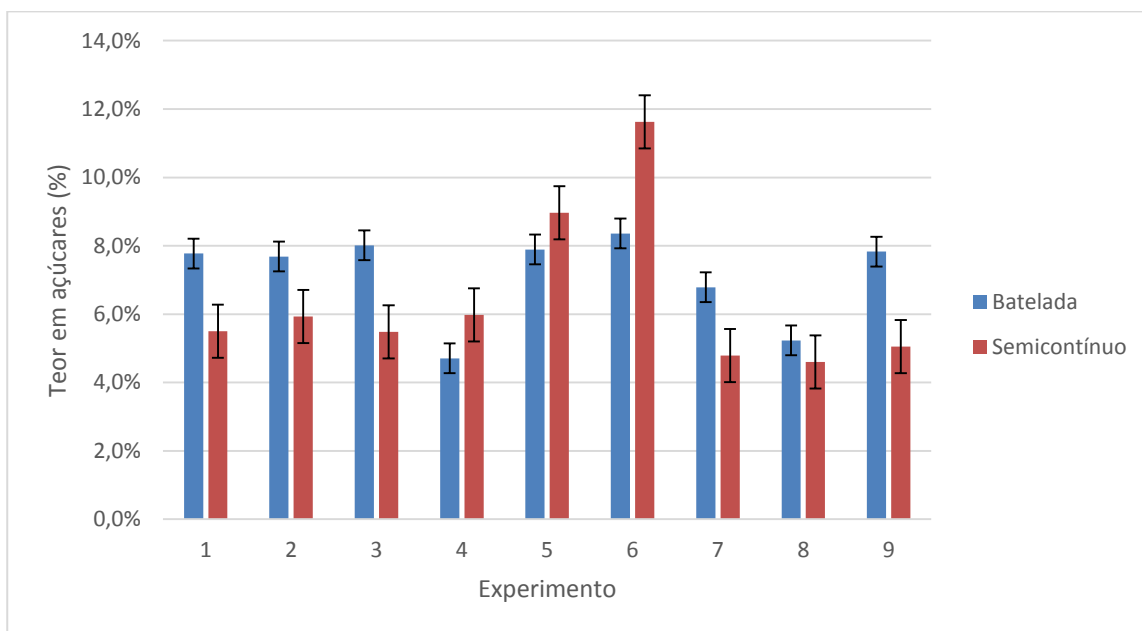
Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a Figura 28, observa-se que o regime semi-contínuo, bem como a mudança no método de colheita de biomassa, possibilitou um aumento considerável nos teores de lipídeos. Assim como o teor em lipídeos, o teor em proteínas também obteve aumentos significativos em algumas condições experimentais, porém, ao se analisar a Figura 29, observa-se que tanto o regime batelada quanto o regime semi-contínuo se apresentaram como boas alternativas na produção de biomassa com altos teores de proteínas, pois, em 95% dos cultivos realizados, o teor de proteínas foi superior a 30%.

Figura 29 - Comparação do teor médio em proteínas em ambos regimes de cultivo.

Fonte: Autoria própria.

Diferente dos demais componentes celulares, os açúcares redutores não obtiveram aumento significativo com a mudança do regime de cultivo, sendo que apenas 3 das 9 condições experimentais no regime semi-contínuo favoreceram o aumento do teor de açúcares em relação aos experimentos realizados no regime em batelada.

Figura 30 - Comparação do teor médio em açúcares em ambos regimes de cultivo.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a Figura 30 pode-se observar que a condição experimental 6, no regime semi-contínuo, obteve o maior teor de açúcares e se apresenta como a condição experimental ideal para a produção desse tipo de produto.

5.2.3 Análises estatísticas

5.2.3.1 Produtividade em Biomassa (PB)

Os valores de produtividade em biomassa alcançados ao final de cada experimento seguem apresentados na Tabela 9 para análise estatística da influência dos fatores sobre esta variável resposta.

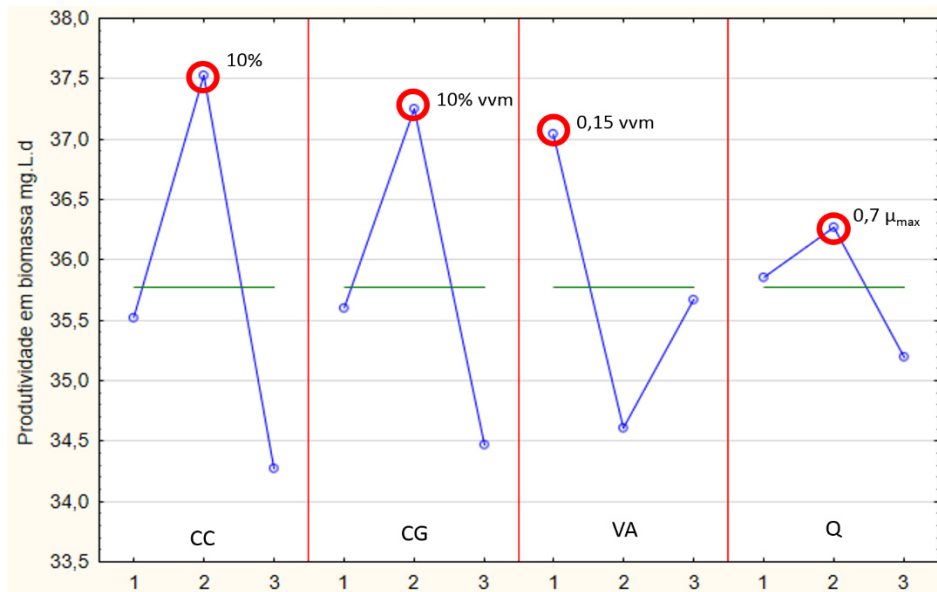
Tabela 9 - Produtividade em biomassa obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.

Experimento	Fatores				Produtividade em biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)		
	CC	CG	VA	Q	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	1	1	1	1	77,88	59,85	68,86
2	1	2	2	2	64,47	66,49	65,48
3	1	3	3	3	74,72	30,26	52,49
4	2	1	2	3	56,81	64,16	60,48
5	2	2	3	1	87,7	90,24	88,97
6	2	3	1	2	70,11	89,66	79,89
7	3	1	3	2	52,05	54,14	53,09
8	3	2	1	3	60,16	73,33	66,74
9	3	3	2	1	58,54	26,42	42,48

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 31 apresenta o gráfico de efeitos da variável resposta Produtividade em Biomassa (PB), com relação aos quatro parâmetros analisados para o cultivo em batelada (concentração de chorume (CC), concentração de gás carbônico na corrente gasosa (CG), vazão de aeração (VA) e vazão da corrente de alimentação (Q).

Figura 31 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em biomassa.

Fonte: Autoria própria.

Ao observar o gráfico de efeitos apresentado na Figura 31, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG está ajustado no nível 2 (10%), o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 2 (0,7 μ_{max}) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado no nível 3 (15%), o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm), e o fator Q está ajustado no nível 3 (0,9 μ_{max}), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Ao analisar o planejamento experimental observa-se que as condições experimentais 5 e 9 se assemelham aos resultados obtidos pelo gráfico de efeitos. Enquanto a condição experimental 5 apresenta a concentração e chorume (CC) e a concentração de CO₂ (CG) no nível adequado, a vazão de aeração (VA) está em um nível muito acima do indicado e a vazão de alimentação (Q) está em nível insuficiente. Afim de aprofundar o estudo estatístico, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar a significância de cada fator sobre a variável resposta. Essa análise classifica como significativo todo o fator cujo p-valor é inferior a 0,05, adotando 95% de confiabilidade nos dados obtidos.

A Tabela 10 apresenta os resultados da ANOVA (Análise de Variância) dos fatores estudados sobre a Produtividade de Biomassa (PB) obtida no regime semi-contínuo.

Tabela 10 - Análise de variância sobre a produtividade em biomassa obtida no regime semi-contínuo.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
CC	32,25936	2	16,12968	2,350568	0,150899
CG	23,40507	2	11,70254	1,705403	0,235500
VA	17,76795	2	8,88397	1,294656	0,320503
Q	3,46693	2	1,73347	0,252617	0,782094
Residual	61,75832	9	6,86204		

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação; SQF = Soma quadrática dos fatores; GL = Graus de liberdade; SMQF = Soma média quadrática dos fatores; F = Teste F e p = nível de significância.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise, apresentada na Tabela 10, pode-se afirmar que nenhum dos fatores obteve influência no valor obtido da variável resposta, sendo necessário novas réplicas para confirmar os dados estatísticos dessa variável resposta.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles obtidos por Zhao et al. (2014). Ao analisarem os efeitos destas variáveis no rendimento em biomassa da *Chlorella sp*, cultivada em reatores do tipo colunas de bolhas, os autores relatam que o aumento na concentração de CO₂ (quando esta variou de 10 a 20%), assim como na vazão de aeração (de 0,1 a 0,2 vvm) exerceram efeitos negativos no crescimento microalgal. No presente trabalho, vazões de aeração mais elevadas proporcionaram maiores taxas de crescimento microalgal.

Uma possível explicação para tal discrepância está na utilização de soluções de chorume como meio de cultivo; nesse caso, como o metabolismo é mixotrófico, maiores taxas de aeração favorecem o crescimento no chorume, visto que um efeito de turbulência apropriado ajuda a melhorar o desempenho das microalgas, em termos de fixação do CO₂ e produção de biomassa (BENEMANN; OSWALD, 1996).

Os resultados obtidos nesse trabalho também vão de encontro com os resultados encontrados por Moreira et al. (2016). Durante o cultivo de *Spirulina sp* em regime semi-contínuo, com adição de 10% (v/v) de CO₂, o valor médio da produtividade em biomassa variou entre 105 mg L⁻¹ d⁻¹ e 108 mg L⁻¹ d⁻¹ enquanto que a produtividade em biomassa da *Chlorella fusca* variou entre 62 mg L⁻¹ d⁻¹ e 79 mg L⁻¹ d⁻¹. Tais valores são condizentes com os encontrados nesse trabalho, corroborando a metodologia aplicada.

Benvenuti et al. (2016) compararam a produtividade em biomassa da microalga *Nannochloropsis sp* em cultivos em batelada e semi-contínuo. Os cultivos foram realizados em reatores tubulares com volume útil de 170L e as produtividades em biomassa foram de 680 mg

$L^{-1} d^{-1}$ e $1940 \text{ mg L}^{-1} d^{-1}$, respectivamente. Valores tão elevados podem ser justificados pelo volume útil do reator, cerca de 40 vezes maior que o aplicado nesse trabalho, e, assim como foi apresentado, a produtividade obtida no regime semi-contínuo foi três vezes superior à obtida em regime batelada.

5.2.3.2 Produtividade em Lipídeos (PL)

Os valores de produtividade em lipídeos alcançados ao final de cada experimento seguem na Tabela 11 para análise estatística sobre esta variável resposta.

Tabela 11 - Produtividade em lipídeos obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.

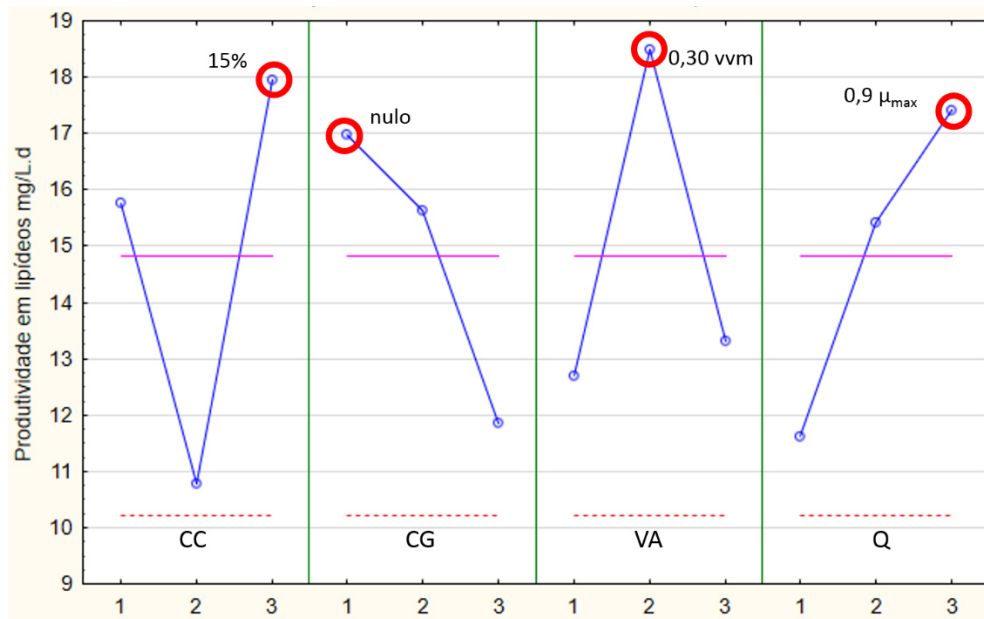
Experimento	Fatores				Produtividade em lipídeos ($\text{mg L}^{-1} d^{-1}$)		
	CC	CG	VA	Q	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	1	1	1	1	9,19	1,97	5,58
2	1	2	2	2	9,39	12,85	11,12
3	1	3	3	3	4,84	5,04	4,94
4	2	1	2	3	9,59	8,67	9,13
5	2	2	3	1	2,49	1,94	2,22
6	2	3	1	2	1,18	3,59	2,39
7	3	1	3	2	9,07	9,17	9,12
8	3	2	1	3	8,52	9,77	9,15
9	3	3	2	1	5,79	6,09	5,94

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO_2 na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação.

Fonte: Autoria própria.

O gráfico de efeitos sobre a Produtividade em Lipídeos (PL), para o regime semi-contínuo, está esboçado na Figura 32.

Figura 32 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em lipídeos.



Fonte: Autoria própria.

Ao observar o gráfico de efeitos apresentado na Figura 32, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado no nível 1 (nulo), o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 3 ($0,9\mu_{\max}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado.

Em contrapartida, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG está ajustado no nível 3 (15% vmm), o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), e o fator Q está ajustado no nível 1 ($0,5\mu_{\max}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Ao analisar o planejamento experimental observa-se que a condição experimental 6 se assemelha aos resultados obtidos pelo gráfico de efeitos. Assim como apresentado pelo gráfico, essa condição experimental possui níveis dos fatores CC, CG e VA inadequados para a produção de lipídeos e nenhuma condição experimental se enquadrou no melhor ajuste proposto.

Afim de aprofundar o estudo estatístico, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar a significância de cada fator sobre a variável resposta (Tabela 12). Essa análise classifica como significativo todo o fator cujo p-valor é inferior a 0,05.

Tabela 12 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade em lipídeos obtida no regime semi-contínuo.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
CC	162,8021	2	81,40105	5,105785	0,032965
CG	84,2913	2	42,14566	2,643536	0,124982
VA	122,2328	2	61,11642	3,833455	0,062480
Q	103,9771	2	51,98856	3,260921	0,086069
Residual	143,4862	9	15,94291		

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação; SQF = Soma quadrática dos fatores; GL = Graus de liberdade; SMQF = Soma média quadrática dos fatores; F = Teste F e p = nível de significância.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise, apresentada na Tabela 12, pode-se afirmar que a concentração de chorume se apresentou como fator significativo nessa variável resposta para uma confiabilidade de 95%. Contudo, se adotarmos uma confiabilidade de 90%, a vazão de aeração e a vazão de alimentação se mostram também como fatores significativos. A influência do meio de cultivo na produtividade lipídica foi estudada por diversos autores. No trabalho desenvolvido por Zhao et al. (2014) os teores médios de lipídeos se concentraram entre 14,5 – 20,8%, utilizando uma diluição de lixiviado de 10% no meio de cultivo e operando o sistema em batelada.

Kuo et al. (2016) compararam as produtividades lipídicas de cultivos em batelada e semi-contínuo da microalga *Chlorella sp* em efluentes e observou uma diferença de 30% entre ambas, sendo a produtividade em regime batelada superior. Tal fato pode ser explicado devido ao comportamento metabólico da célula de microalga que, nos primeiros dias de cultivo, tende a produzir carboidratos com o intuito de superar possíveis problemas com ausência de nutrientes (SIAUT et al., 2011).

Hsieh e Wu (2009) também cultivaram *Chlorella sp* e estudaram a produtividade em biomassa e em lipídeos desses cultivos em sistemas com variação de concentração de uréia, tanto em batelada quanto em semi-contínuo. Os resultados indicaram que para a mesma concentração de uréia (25 mg/L), o regime semi-contínuo obteve produtividade lipídica duas vezes maior que a obtida no sistema em batelada (113 mg L⁻¹ d⁻¹ e 51 mg L⁻¹ d⁻¹). A partir do aumento da concentração de ureia, observou-se que a produtividade lipídica entre ambos os regimes de cultivo era próxima, porém a produtividade obtida no regime semi-contínuo foi 12% superior.

No trabalho desenvolvido por Fuentes-Grünewald et al. (2015) o cultivo da microalga *Porphyridium purpureum* obteve teor máximo de lipídeos de 19% quando operado em regime

semi-contínuo, e indicou-se que esse tipo de sistema é o mais indicado para cultivar essa espécie em latitudes mais elevadas pois, além de um bom teor lipídico, a taxa de crescimento e a produtividade em biomassa também foram elevadas. A produtividade lipídica também foi fator de estudos de Feng et al. (2014) ao compararem o crescimento e o acúmulo de lipídeos nas células de seis microalgas distintas cultivadas em regime semicontínuo. Os resultados obtidos indicaram que, entre as seis espécies de microalgas, a *Scenedesmus obliquus* foi a que obteve a maior produtividade, seguida pela *Chlorococcum sp*, indicando que, para diversas espécies, o regime semi-contínuo é adequado para maximizar a produção em biomassa e lipídeos.

5.2.3.3 Produtividade em Açúcares Redutores (PAR)

Os valores de produtividade em açúcares alcançados ao final de cada experimento seguem apresentados na Tabela 13 para análise estatística da influência dos fatores sobre esta variável resposta. O gráfico de efeitos sobre a Produtividade em Açúcares Redutores (PAR) está esboçado na Figura 33.

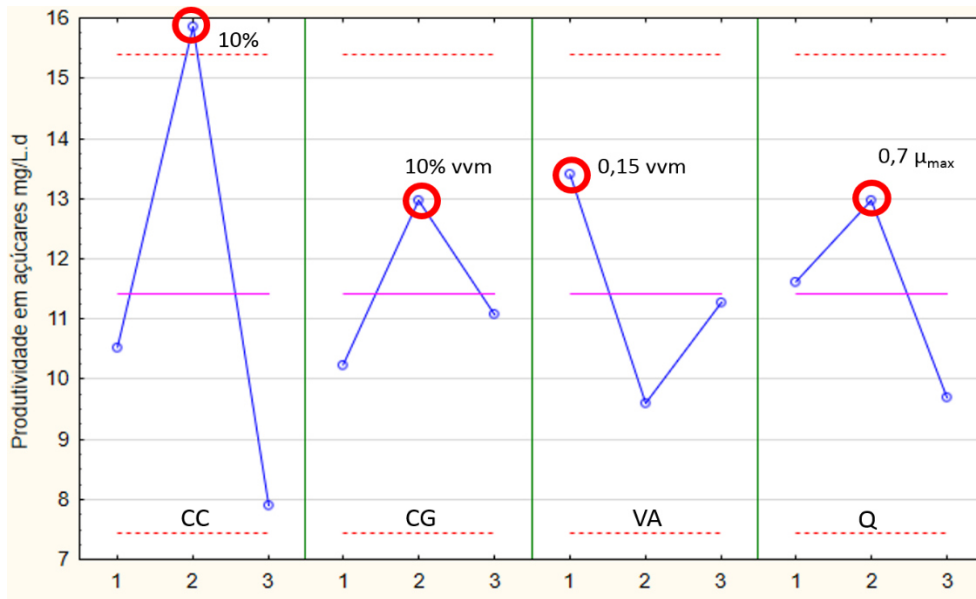
Tabela 13 - Produtividade em açúcares obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.

Experimento	Fatores				Produtividade em açúcares (mg L ⁻¹ d ⁻¹)		
	CC	CG	VA	Q	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	1	1	1	1	4,15	3,39	3,77
2	1	2	2	2	3,96	3,81	3,88
3	1	3	3	3	3,89	1,74	2,82
4	2	1	2	3	3,62	3,58	3,60
5	2	2	3	1	5,01	11,02	8,02
6	2	3	1	2	6,15	12,98	9,57
7	3	1	3	2	2,34	2,75	2,54
8	3	2	1	3	2,96	3,14	3,05
9	3	3	2	1	3,20	1,22	2,21

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de Aeração e Q = Vazão de alimentação.

Fonte: Autoria própria.

Figura 33 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em açúcares redutores.



Fonte: Autoria própria.

Ao observar o gráfico de efeitos apresentado na Figura 33, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG está ajustado no nível 2 (10% vvm), o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 2 ($0,7\mu_{\max}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado. Em contrapartida, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado no nível 1 (nulo), o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm), e o fator Q está ajustado no nível 3 ($0,9\mu_{\max}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Ao analisar o planejamento experimental observa-se que a condição experimental 6 se assemelha aos resultados obtidos pelo gráfico de efeitos. Assim como apresentado pelo gráfico, essa condição experimental possui níveis dos fatores CC, VA e Q adequados para maximizar a produção de carboidratos. Além disso, a condição experimental 7, que obteve a segunda pior produtividade, possui dois fatores ajustados ao nível proposto pelo gráfico de efeitos como indicados para minizar a produção de carboidratos.

Afim de se aprofundar o estudo estatístico, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar a significância de cada fator sobre a variável resposta. Essa análise classifica como significativo todo o fator cujo p-valor é inferior a 0,05, cujos resultados estão na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise de variância dos fatores estudados sobre a produtividade em açúcares obtida no regime semi-contínuo.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
CC	197,4569	2	98,72845	8,327678	0,008970
CG	23,4518	2	11,72592	0,989073	0,408988
VA	43,2241	2	21,61204	1,822961	0,216428
Q	32,1782	2	16,08909	1,357103	0,305410
Residual	106,6992	9	11,85546		

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação; SQF = Soma quadrática dos fatores; GL = Graus de liberdade; SMQF = Soma média quadrática dos fatores; F = Teste F e p = nível de significância.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise, apresentada na Tabela 14, pode-se afirmar que a concentração de chorume se apresentou como fator significativo nessa variável resposta enquanto os demais não atingiram a mesma significância.

Assim como os lipídeos, os carboidratos também sofreram influência direta da concentração de chorume. No trabalho desenvolvido por Tagliaferro et al. (2019), o maior teor de carboidratos encontrado foi de 15% na condição experimental que aplicava uma diluição de lixiviado de 10%, coincidindo com o nível de concentração de chorume indicado pelo gráfico de efeitos. Além disso, o autor observou que para concentrações menores de lixiviado, o teor máximo de carboidratos foi de 9%.

Silva, Sforza e Bertucco (2017) buscaram maximizar a produtividade em carboidratos através do cultivo contínuo de duas espécies de microalga (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*) em reator de paredes planas e aplicando uma limitação de nitrogênio. Os resultados obtidos indicaram que esse tipo de metodologia possibilitou grande aumento do teor de carboidratos, atingindo produtividades de 350 mg L⁻¹ d⁻¹ (*Chlorella vulgaris*) e 800 mg L⁻¹ d⁻¹ (*Scenedesmus obliquus*), valores muito superiores aos encontrados nesse trabalho.

Além da concentração do chorume, diversos fatores também podem alterar o metabolismo da célula de microalga e influenciar na produção de carboidratos. García-Cubero et al. (2018) verificaram que tanto o pH quanto a luminosidade eram fatores que alteravam, consideravelmente, o teor de carboidratos. Ao variar o pH entre 6,5 e 9,0, os valores do teor de carboidratos variaram entre 3% e 13%, respectivamente, sendo 13% o valor máximo atingido num valor de pH igual a 8,5. Os autores também observaram que a luminosidade de 1000 μmol_{PAR} m⁻² s⁻¹ proporcionou o melhor teor de carboidratos, cerca de 10%.

5.2.3.4 Produtividade em Proteínas (PP)

Os valores de produtividade em proteínas alcançados ao final de cada experimento seguem apresentados na Tabela 15 para análise estatística da influência dos fatores sobre esta variável resposta.

Tabela 15 - Produtividade em proteínas obtida em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.

Experimento	Fatores				Produtividade em proteínas (mg L ⁻¹ d ⁻¹)		
	CC	CG	VA	Q	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	1	1	1	1	14,6	80,12	47,36
2	1	2	2	2	55,54	53,55	54,55
3	1	3	3	3	68,72	101,59	85,16
4	2	1	2	3	117,45	115,07	116,26
5	2	2	3	1	15,84	11,33	13,59
6	2	3	1	2	14,77	4,21	9,49
7	3	1	3	2	147,65	177,7	162,68
8	3	2	1	3	363,95	424,1	394,03
9	3	3	2	1	229,3	285,28	257,29

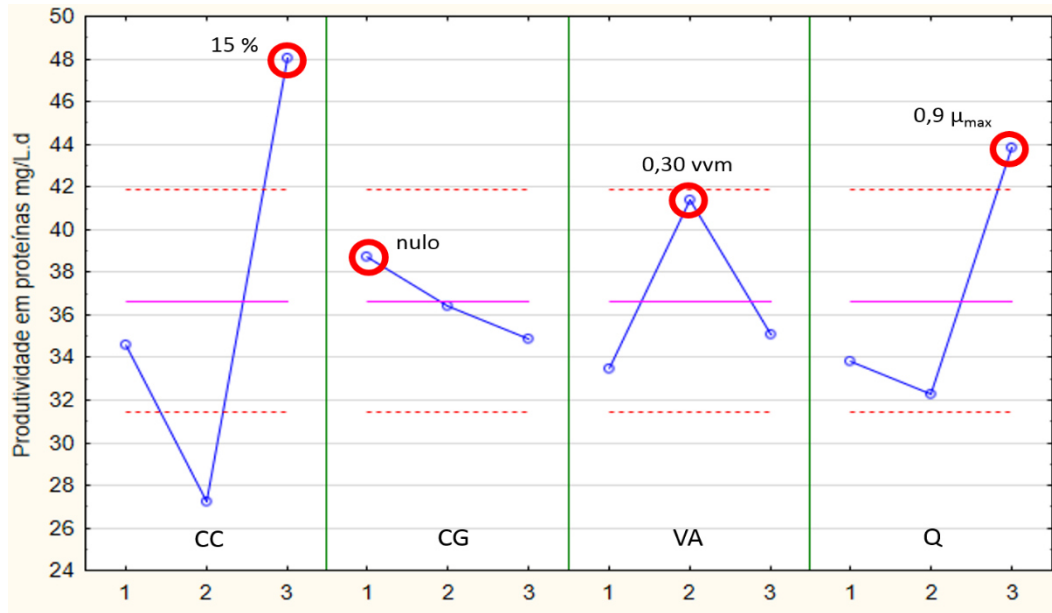
Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar o planejamento experimental observa-se que a condição experimental 6 corresponde exatamente ao ajuste necessário para diminuir a produtividade em proteínas. Tal fato se justifica pela grande quantidade de carboidratos produzidos nessa condição experimental, indicando a seletividade do metabolismo da microalga de acordo com as condições do experimento. Além disso, os experimentos 8 e 9, possuem dois fatores ajustados ao nível proposto pelo gráfico de efeitos como indicados para maximizar a produção de proteínas.

A Figura 34 apresenta o gráfico de efeitos dos quatro fatores analisados para a variável de resposta Produtividade em Proteínas (PP), durante o cultivo em regime semi-contínuo.

Figura 34 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta produtividade em proteínas.



Fonte: Autoria própria.

Ao observar o gráfico de efeitos apresentado na Figura 34, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado no nível 1 (nulo), o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 3 ($0,9\mu_{\max}$) a variável resposta tem o seu valor maximizado.

Em contrapartida, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG está ajustado no nível 3 (15% vvm), o fator VA está ajustado no nível 1 (0,15 vvm), e o fator Q está ajustado no nível 2 ($0,7\mu_{\max}$), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Para a Produtividade em Proteínas (PP) também foi realizada a ANOVA (Tabela 16), para verificar a significância de cada fator sobre a variável resposta.

Tabela 16 - Análise de variância sobre a produtividade em proteínas obtida no regime semi-contínuo.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	P
CC	1337,094	2	668,5471	32,91386	0,000073
CG	45,843	2	22,9216	1,12847	0,365341
VA	210,091	2	105,0457	5,17160	0,031968
Q	476,656	2	238,3277	11,73333	0,003109
Residual	182,808	9	20,3120		

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação; SQF = Soma quadrática dos fatores; GL = Graus de liberdade; SMQF = Soma média quadrática dos fatores; F = Teste F e p = nível de significância.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise, apresentada na Tabela 16, pode-se afirmar que apenas a concentração de gás carbônico não se apresenta como fator significativo nessa variável resposta. Tal fato é justificado pelo melhor ajuste proposto pelo gráfico de efeitos, pois a concentração de gás carbônico indicada é nula.

Conforme descrito anteriormente, as proteínas ocupam posição de interesse dos setores alimentícios devido à demanda de produtos enriquecidos com proteínas e que possuam baixas concentrações de gorduras, sódio, etc. Com esse intuito, diversos trabalhos publicados buscaram otimizar o processo de obtenção de proteínas em células microalgais. No trabalho desenvolvido por Tagliaferro (2017), em condições de cultivo semelhantes aos aplicados nesse trabalho, os teores de proteínas se mantiveram próximos a 30% e eram independentes da concentração de lixiviado, que se mantinha entre 5% e 10% do volume total do reator.

T Lam et al. (2017) estudaram a obtenção de proteínas a partir da exposição das biomassas de *Chlorella vulgaris* e *Neochloris oleoabundans* a campos de pulsos elétricos com voltagens distintas. Apesar da utilização de uma nova tecnologia, os resultados foram abaixo do esperado, obtendo valores de teor de proteínas na faixa de 2,5% a 3,2% para a *Chlorella vulgaris* e entre 1,9% e 2,5% para a *Neochloris oleoabundans*, ambas cultivadas em regime semi-contínuo. Quando cultivadas em regime batelada, o teor máximo de proteínas obtido foi de 13% pela *Neochloris oleoabundans*. Isso significa que, independente do sistema de cultivo e da condição experimental, o procedimento para a obtenção das proteínas deve ser o mais eficaz possível.

Garcia-Moscoso et al. (2013) aplicaram a hidrólise instantânea para quantificar as proteínas produzidas pela microalga *Scenedesmus sp* em reator de coluna de bolhas com pH alcalino. Em comparação com o método citado no parágrafo anterior, a hidrólise se apresentou como metodologia de grande eficiência, obtendo valores de produtividade em proteínas na faixa de 1448 mg L⁻¹ d⁻¹ a 3184 mg L⁻¹ d⁻¹.

5.2.4 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Os valores das DQOs no primeiro e último dia de cada cultivo e a respectiva redução percentual estão representados na Tabela 17.

Tabela 17 - Redução da Demanda Química de Oxigênio proporcionada por cada experimento em regime semi-contínuo.

Experimento	DQO (mg O₂.L⁻¹)	DQO (mg O₂.L⁻¹)	Redução obtida (%)
1	7,832	7,014	10,44
2	7,398	7,384	0,19
3	8,590	7,101	17,33
4	9,138	8,910	2,50
5	8,326	8,143	2,20
6	8,454	7,823	7,46
7	8,368	8,197	2,05
8	9,042	8,999	0,48
9	8,130	7,840	4

Fonte: Autoria própria.

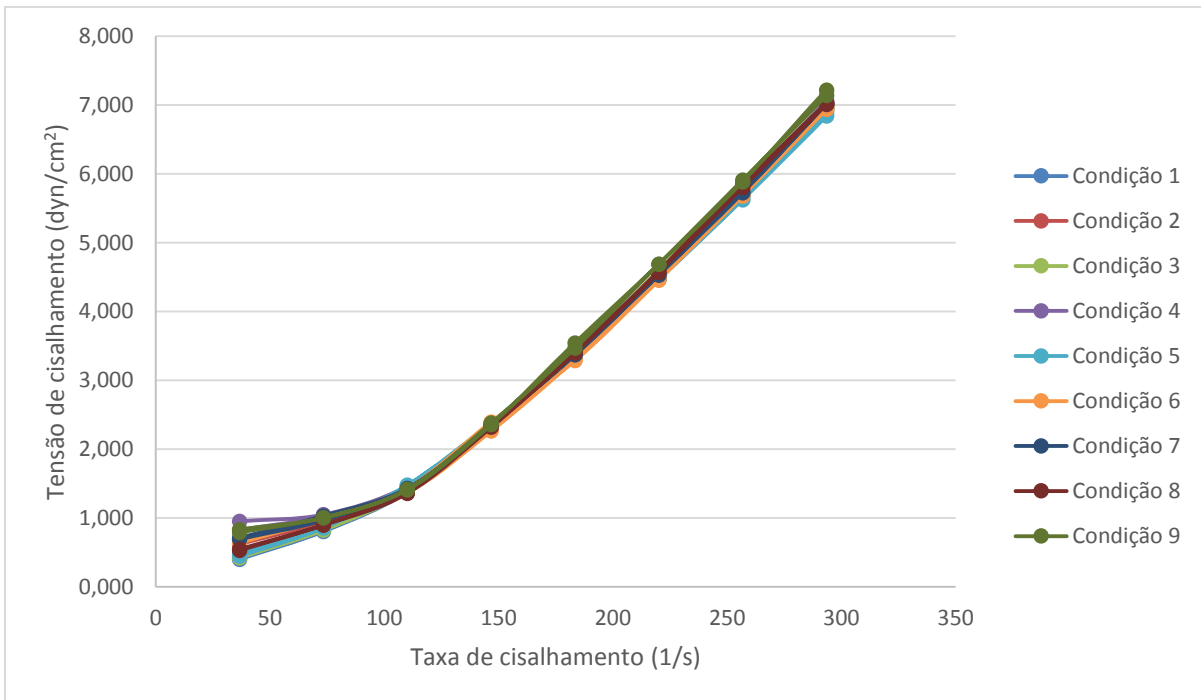
A partir da análise da Tabela 17 pode-se verificar que o experimento 3 foi o que proporcionou a melhor redução de DQO, na faixa de 17,33%. Como pode se observar, as reduções obtidas de DQO foram muito aquém do que era pretendido, ainda mais quando comparado com as reduções obtidas durante os cultivos em batelada. Porém, tal fato não é totalmente novo na literatura, pois Markou, Iconomou e Muylaert (2016) verificaram que os cultivos de *Arthospira platensis*, no tratamento de efluente de avícolas, apresentaram redução mínima nos valores de DQO (abaixo de 5%) e, em alguns casos, houve acréscimo do valor.

Raposo et al. (2010) também verificaram a eficiência da microalga *Chlorella vulgaris* no tratamento de efluente de uma cervejaria, constatando que, em meios de cultivo contendo alta concentração de efluente, a redução da DQO pode ser prejudicada caso não existam outros parâmetros que auxiliam na decomposição da matéria orgânica, por esse motivo a redução de DQO encontrada por esses autores foi de apenas 12%.

5.2.5 Análises reológicas

Os gráficos da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, obtidos nas diferentes condições do experimento encontram-se na Figura 35, onde os resultados apresentados são as médias das duplicatas experimentais.

Figura 35 - Reogramas da suspensão de *Chlorella minutissima*, nas diferentes condições de processo.

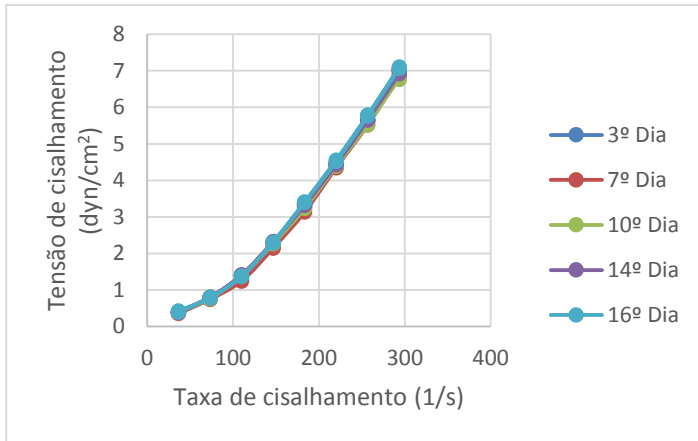


Fonte: Autoria própria.

Da figura anterior observam-se curvas características de um fluido dilatante (SINGH; HELDMAN, 2003). Os resultados da Figura 35 foram coerentes também com as observações feitas por Tischer (2006) que relatou comportamento reológico semelhante ao analisar as propriedades reológicas das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae*.

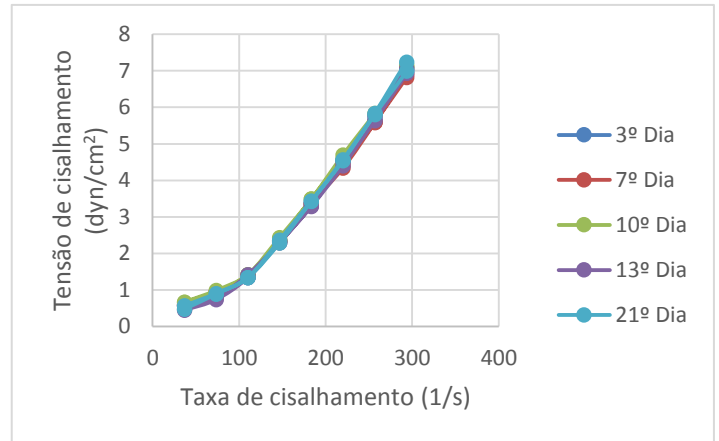
De modo a verificar a influência do tempo de cultivo no comportamento reológico da suspensão da microalga *Chlorella minutissima*, os gráficos da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento obtidos diariamente, nas diferentes condições do experimento, encontram-se nas Figuras 36 a 44.

Figura 36 - Reograma da condição experimental 1.



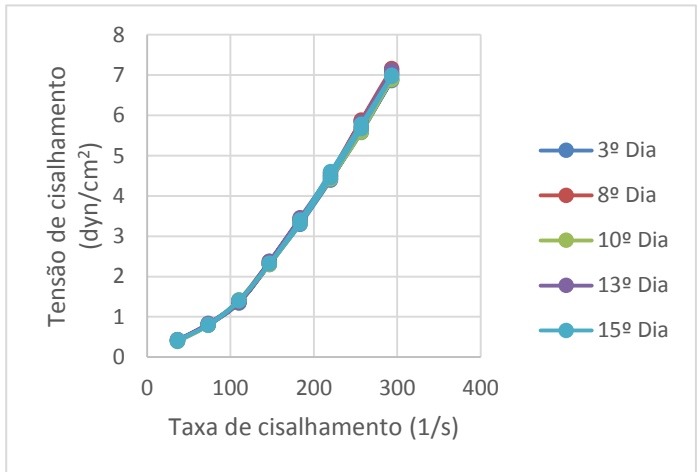
Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Reograma da condição experimental 2.



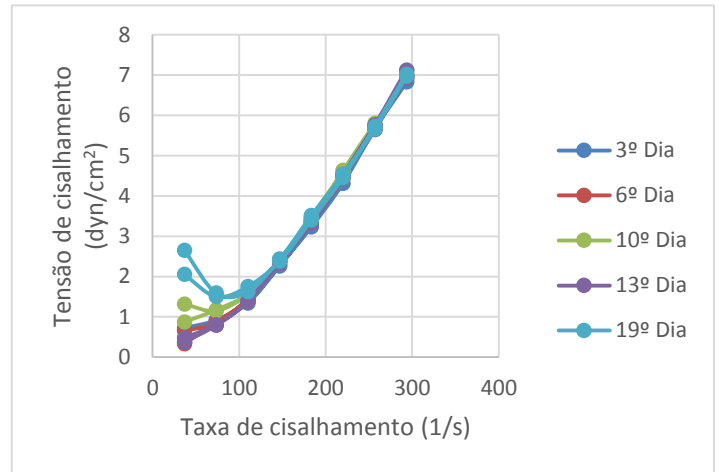
Fonte: Autoria própria.

Figura 38 - Reograma da condição experimental 3.



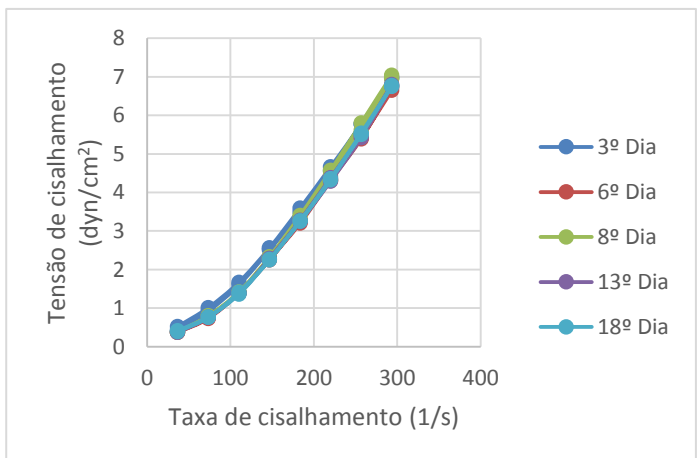
Fonte: Autoria própria.

Figura 39 - Reograma da condição experimental 4.



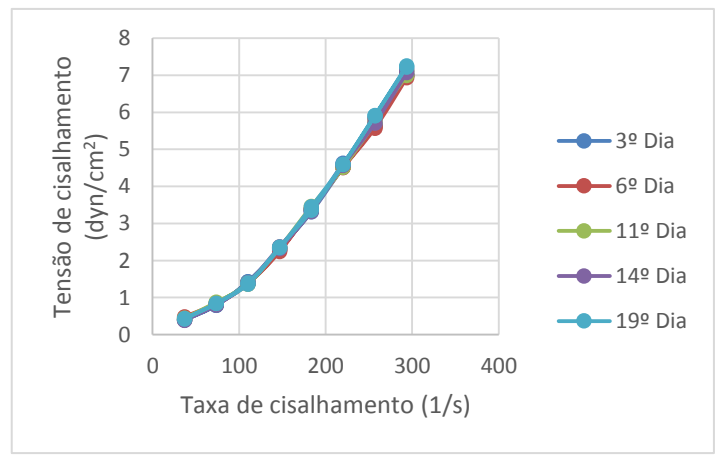
Fonte: Autoria própria.

Figura 40 - Reograma da condição experimental 5.

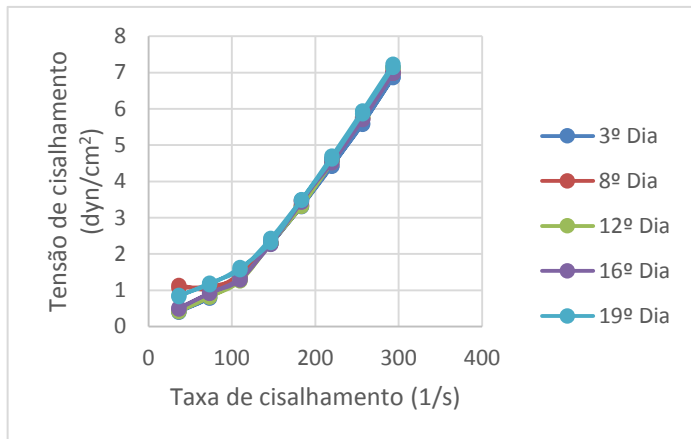


Fonte: Autoria própria.

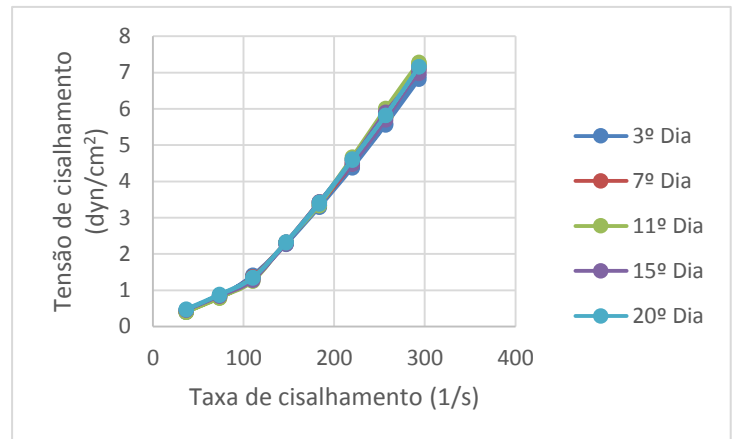
Figura 41 - Reograma da condição experimental 6.



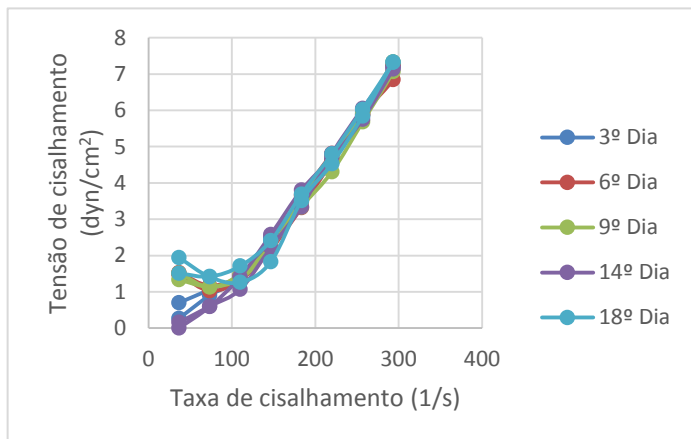
Fonte: Autoria própria.

Figura 42 - Reograma da condição experimental 7.

Fonte: Autoria própria.

Figura 43 - Reograma da condição experimental 8.

Fonte: Autoria própria.

Figura 44 - Reograma da condição experimental 9.

Fonte: Autoria própria.

Dos gráficos anteriores observa-se que o tempo de processamento praticamente não exerceu influência nos reogramas da suspensão da microalga *Chlorella minutissima*, exceto nas condições de baixo teor da fonte de carbono (condições 4 e 7) ou baixa vazão de alimentação (condições 5 e 9), condições estas que contribuem para maior sedimentação das partículas em suspensão.

5.2.5.1 Análise estatística dos índices de comportamento (n) e consistência (k)

Assim como nos cultivos em batelada, além de se avaliar o tipo de comportamento reológico das suspensões de microalgas e verificar que o mesmo se adequa ao comportamento de um fluido dilatante, fez-se necessário avaliar também se algum dos fatores aplicados no processo obteve qualquer influência sobre essas duas variáveis respostas.

Novamente, ao contrário da análise feita para as produtividades em biomassa, lipídeos, açúcares redutores e proteínas, a análise estatística para ambos os índices irá buscar o ajuste que minimize o valor de ambos, de maneira a aproximar o comportamento da suspensão de microalgas ao de um fluido Newtoniano. Os valores do índice de comportamento (n) alcançados ao final de cada experimento seguem apresentados na Tabela 18 para análise estatística da influência dos fatores sobre esta variável resposta. A Figura 45 apresenta o gráfico de efeitos sobre o índice de comportamento, considerando todos os fatores analisados.

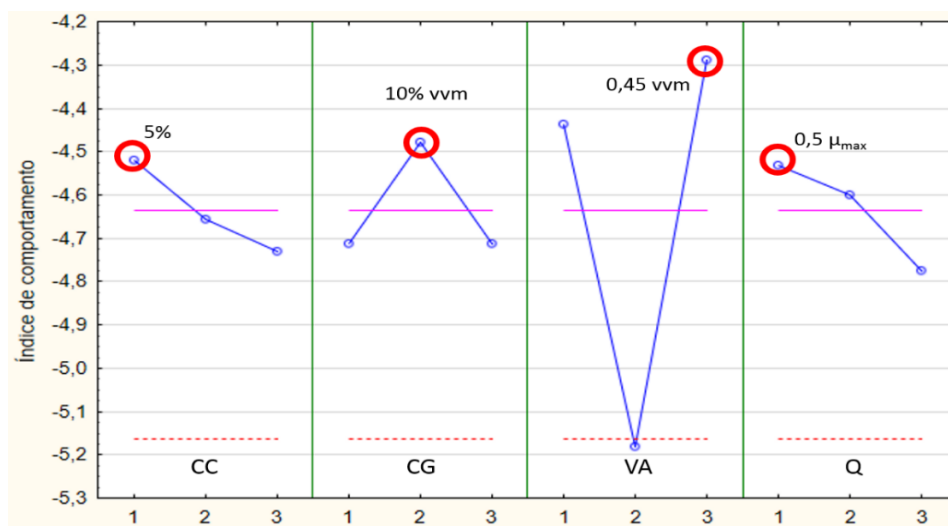
Tabela 18 - Índice de comportamento em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.

Experimento	Fatores				Índice de comportamento		
	CC	CG	VA	Q	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	1	1	1	1	1,649	1,630	1,640
2	1	2	2	2	1,710	1,795	1,753
3	1	3	3	3	1,667	1,649	1,658
4	2	1	2	3	1,880	1,853	1,867
5	2	2	3	1	1,593	1,595	1,594
6	2	3	1	2	1,673	1,685	1,679
7	3	1	3	2	1,682	1,648	1,665
8	3	2	1	3	1,689	1,673	1,681
9	3	3	2	1	1,643	2,038	1,841

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação.

Fonte: Autoria própria.

Figura 45 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de comportamento (n).



Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do gráfico de efeitos apresentado na Figura 45, pode-se afirmar que a vazão de aeração (VA) foi o fator que obteve maior influência sobre a variável resposta, sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 1 (5%), o fator CG está ajustado no nível 2 (10% vvm), o fator VA está ajustado no nível 3 (0,45 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 1 (0,5 μ_{\max}), a variável resposta tem o seu valor minimizado, o que justifica o resultado obtido na condição experimental 5, pois essa condição possui três fatores ajustados nos níveis adequados.

Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado nos níveis 1 ou 3 (nulo ou 15% vvm), o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 3 (0,9 μ_{\max}), a variável resposta tem o seu valor maximizado, corroborando com os resultados obtidos nas condições 4 e 9, ambas as condições possuem três fatores ajustados nos níveis adequados.

Com relação ao índice de comportamento (n), para que se pudesse aprofundar o estudo estatístico, realizou-se a análise de variância (ANOVA), cujos resultados estão expressos na Tabela 19.

Tabela 19 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o índice de comportamento obtido no regime semi-contínuo.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
CC	0,137199	2	0,068600	0,328707	0,728145
CG	0,224024	2	0,112012	0,536725	0,602267
VA	2,735020	2	1,367510	6,552661	0,017533
Q	0,189204	2	0,094602	0,453302	0,649277
Residual	1,878258	9	0,208695		

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação; SQF = Soma quadrática dos fatores; GL = Graus de liberdade; SMQF = Soma média quadrática dos fatores; F = Teste F e p = nível de significância.

Fonte: Autoria própria.

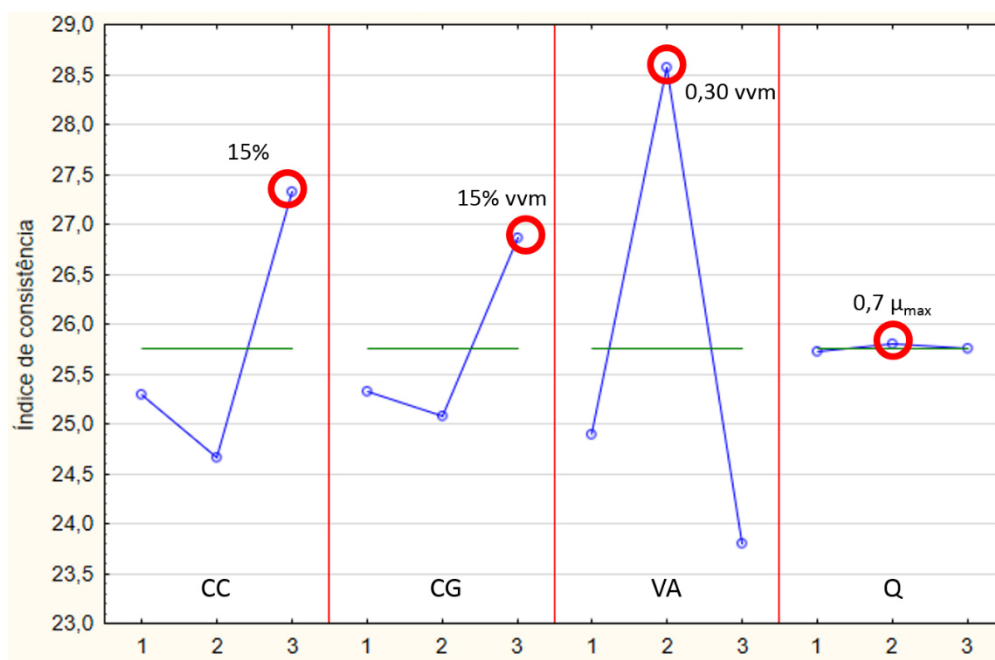
A partir da análise, apresentada na Tabela 19, pode-se afirmar que apenas a vazão de aeração se apresentou como fator significativo nessa variável resposta. Tal fato é justificado pelo melhor ajuste proposto pelo gráfico de efeitos, pois a vazão de aeração, ajustada no nível máximo, proporcionou melhor agitação do cultivo e contribuiu para a ausência de acúmulo de biomassa.

Assim como o índice de comportamento, os valores do índice de consistência (k) alcançados ao final de cada experimento seguem apresentados na Tabela 20 e Figura 46.

Tabela 20 - Índice de consistência em cada condição experimental durante o regime semi-contínuo.

Experimento	Fatores				Índice de comportamento		
	CC	CG	VA	Q	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	1	1	1	1	0,0610	0,0660	0,0635
2	1	2	2	2	0,0470	0,0380	0,0425
3	1	3	3	3	0,0590	0,0610	0,0600
4	2	1	2	3	0,0430	0,0460	0,0445
5	2	2	3	1	0,0800	0,0790	0,0795
6	2	3	1	2	0,0570	0,0560	0,0565
7	3	1	3	2	0,0530	0,0600	0,0565
8	3	2	1	3	0,0500	0,0530	0,0515
9	3	3	2	1	0,0630	0,0120	0,0375

Nota: CC = Concentração de Chorumbe; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação.

Figura 46 - Gráfico de efeitos dos fatores sobre a variável resposta índice de consistência (k).

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do gráfico de efeitos apresentado na Figura 46, pode-se afirmar que a vazão de aeração (VA) foi o fator que obteve maior influência sobre a variável resposta, sendo que, quando o fator CC está ajustado no nível 3 (15%), o fator CG está ajustado no nível 3 (15% vvm), o fator VA está ajustado no nível 2 (0,30 vvm) e o fator Q está ajustado no nível 2 (0,7 μ_{\max}), a variável resposta tem o seu valor minimizado.

Infelizmente não há nenhuma condição experimental que se adeque perfeitamente ao melhor ajuste, contudo, a condição experimental 2 possui dois fatores ajustados nos níveis adequados, justificando em parte os baixos valores obtidos.

Além disso, quando o fator CC está ajustado no nível 2 (10%), o fator CG está ajustado nos níveis 2 (10% vvm), o fator VA está ajustado no nível 3 (0,45 vvm) e o fator Q está ajustado nos níveis 1 ou 3 ($0,5\mu_{\max}$ ou $0,9\mu_{\max}$), a variável resposta tem o seu valor maximizado, como pode ser observado na condição experimental 5, em que os níveis estão ajustados perfeitamente, produzindo o maior valor do índice de comportamento dentre todas as condições experimentais.

A Tabela 21 apresenta o valor da ANOVA, para este parâmetro reológico (índice de consistência – K).

Tabela 21 - Análise de variância dos fatores estudados sobre o índice de consistência obtido no regime semi-contínuo.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
CC	23,1299	2	11,56495	0,976364	0,413277
CG	11,3263	2	5,66317	0,478109	0,634843
VA	75,1531	2	37,57655	3,172377	0,090630
Q	0,0230	2	0,01148	0,000969	0,999032
Residual	106,6043	9	11,84492		

Nota: CC = Concentração de Chorume; CG = Concentração de CO₂ na corrente gasosa; VA = Vazão de aeração e Q = Vazão de alimentação; SQF = Soma quadrática dos fatores; GL = Graus de liberdade; SMQF = Soma média quadrática dos fatores; F = Teste F e p = nível de significância.

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 21, pode-se afirmar que nenhum fator apresentou significância para uma confiabilidade de 95%, porém, ao adotarmos uma confiabilidade de 90%, a vazão de aeração apresentou significância nas condições experimentais.

Adesanya, Vadillo e Mackley (2012) analisaram as propriedades reológicas de suspensões da microalga *Scenedesmus obliquus*, em diferentes concentrações volumétricas, utilizando um reômetro rotacional do tipo *Couette*. Os autores concluíram que existe interação entre as células algais em todas as concentrações analisadas, e que tal interação desempenha importante papel, em termos de viscosidade. De um modo geral, a formação de sistemas coloidais (incluindo as suspensões) envolve a degradação de partículas de dimensões maiores ou a agregação de moléculas de íons pequenos. Em ambos os mecanismos, as taxas de agregação e fragmentação são determinadas predominantemente pelo tamanho da partícula e

pelo gradiente de velocidades, estimado através da energia dissipada por unidade de massa. A taxa de dissipação de energia é responsável pela frequência de colisão e pela energia de impacto entre as partículas colidindo. Baixas taxas de dissipação de energia promoverão agrupamentos do tipo partícula-partícula, enquanto que a turbulência do fluido (resultante de intensa agitação do sistema) provavelmente causará fragmentação dos agregados (MELO; DEL MENEZZI, 2010; SHAMLOU; TITCHENER-HOOKER, 1993).

Lira (2011), ao analisar o comportamento reológico da *Chlorella minutíssima* verificou comportamento não-Newtoniano dilatante, quando cultivada em *erlemneyers* de 75 mL, com agitação controlada (por mesa de agitação orbital) em um meio com baixo teor de Nitrogênio. Nesse caso, a viscosidade não pode ser expressa por um único valor, devendo ser obtida pela tangente em cada ponto do reograma, dependendo da tensão aplicada.

Pelegrine et al. (2016) constataram comportamento reológico típico de um fluido não-Newtoniano dilatante em diferentes condições de cultivo da microalga *Chlorella sp.*, possivelmente devido ao tamanho das células microalgais dispersas (acima de 1 μm) às quais tendem a absorver o líquido intersticial, aproximando-se cada vez mais umas das outras e, conseqüentemente, aumentando o valor da viscosidade aparente do material.

Por outro lado, Wileman, Ozkan e Berberoglu (2012) constataram comportamento Newtoniano em cultivos das microalgas *Nannochloris sp*, *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricornutum* em concentrações inferiores a 20 kg/m^3 . No entanto, a partir de 60 kg/m^3 , as suspensões da *Nannochloris sp* e *Chlorella vulgaris* passaram a apresentar comportamento não-newtoniano, com diferentes graus de sensibilidade à tensão de cisalhamento; para a *Phaeodactylum tricornutum*, tal mudança no comportamento reológico aconteceu a partir de 80 kg/m^3 .

6. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- a concentração de chorume e a vazão de aeração como fatores cruciais em todas as variáveis respostas analisadas no presente trabalho;

- a utilização dos fotobiorreatores em regime semi-contínuo, apesar de produzir uma quantidade menor de biomassa, contribuiu com o aumento dos teores em lipídeos e proteínas na maioria das condições experimentais, promovendo acréscimos de, no mínimo, 30% em ambos;

- dependendo das condições de cultivo aplicadas, bem como a metodologia utilizada para a obtenção da DQO, os valores obtidos não são os mais adequados para a avaliação do tratamento do efluente, exigindo estudos mais aprofundados;

- o comportamento demonstrado pela suspensão de microalgas é equivalente ao de um fluido dilatante;

- a vazão de aeração é o fator que mais contribui para que o comportamento da suspensão se assemelhe ao de um fluido Newtoniano.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos experimentos realizados e nos resultados obtidos após o cultivo da *Chlorella minutíssima* em reatores batelada e semi-contínuo, avaliando sua composição química e comportamento reológico, segure-se os seguintes estudos para trabalhos futuros:

- Aplicar os melhores ajustes para cada variável resposta afim de verificar se realmente atingirão os maiores valores de produtividade;
- Avaliar a influência dos mesmos fatores testados no presente trabalho quanto ao acúmulo de outros produtos, como por exemplo, os pigmentos.
- Promover cultivos com luminosidade em diversas cores diferentes e verificar qual delas possui o maior efeito sobre as produtividades.
- Substituir o gás carbônico injetado na corrente gasosa por acetato de sódio ou carbonato de sódio e verificar sua influência sobre as produtividades.
- Aplicar as mesmas condições experimentais em outras espécies de microalgas salinas, utilizando o mesmo fotobiorreator.
- Produzir biodiesel do óleo gerado na melhor condição experimental para teor de lipídeos e verificar o perfil de ácidos graxos.

REFERÊNCIAS

‘T LAM, G.P., POSTMA, P.R., FERNANDES, D.A., TIMMERMANS, R.A.H., VERMUE, M.H., BARBOSA, M.J., EPPINK, M.H.M., WIJFFELS, R.H., OLIVIERI, G. Pulsed electric field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*. **Algal research**, v. 24, p. 181-187, part A, 2017.

ADESANYA, V. O.; VADILLO, D. C.; MACKLEY, M. R. The rheological characterization of algae suspensions for the production of biofuels. **Journal of Rheology**, v. 56, p. 925-939, n. 4, 2012.

AMARAL, Mateus de Souza. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel**. 2018. 152 f. Tese (Doutorado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018. Doi:10.11606/T.97.2018.tde-03122018-183830. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-03122018-183830/pt-br.php>. Acesso em: 15 Ago. 2019.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, **Dados do desempenho das indústrias do petróleo, do gás natural e dos biocombustíveis e do sistema de abastecimento nacionais no período 2008-2017**, 265 p. 2017. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018>. Acesso em: 13 Maio 2018.

APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water, 21st ed. American Public Health Association**, Washington: Editora Pharmabooks, 2005. 874 p.

BARROS, A.; GONÇALVES, A.; SIMÕES, M.; PIRES, J. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1489–1500, 2015.

BECKER, E. W. Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. v. 2, p. 671-691.

BEJARBANEH, F. T.; BIUKI, N. A.; MORTAZAVI, M. S. Removal of heavy metal (copper) using Microalgae (*Spirulina platensis*) by Taguchi Method. **Journal of Aquatic Ecology**, v. 5, n. 2, p. 11, 2015.

BENEMANN, J.R.; OSWALD, W.J. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. 1996. 216 p. **Final Report (Pittsburgh Energy Technology Center)**, Pittsburgh. 1996. Doi:10.2172/493389. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236362062_Systems_and_Economic_Analysis_of_Microalgae_Ponds_for_Conversion_of_CO2_to_Biomass_Final_Report_to_the_US_Department_of_Energy_Pittsburgh_Energy_Technology_Center. Acesso em: 30 Ago. 2019

BENVENUTI, G. et al. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3167-3177, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

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

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: concept and measurement. 2nd ed.** New York: Academic Press, 2002, 416p.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

CARVALHO JÚNIOR, R. M. **Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise in situ.** 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CHANG, H., QUAN, X., ZHONG, N., ZHANG, Z., LU, C., LI, G., CHENG, Z., YANG, L., High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production. **Bioresource Technology**, v. 266, n. July, p. 374–381, 2018.

CHEAH W.; LING T.; SHOW P.; JUAN J.; CHANG J.; LEE, D. J. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. **Applied Energy**, v. 179, p.609-625, 2016.

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

CHEN C.Y; YEH K.L.; AISYAH R.; LEE D.J.; CHANG J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHEN, F.; CHEN, H.; GONG, X. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. **Bioresource Technology**, v. 62, n. 1-2, p. 19-24, 1997.

CHIRANJEEVI, P.; VENKATA MOHAN, S. Optimizing the critical factors for lipid productivity during stress phased heterotrophic microalgae cultivation. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, 26 p., 2016.

CHOU, A. H.; CHEN, L.; ZHANG, X.R.; JIANG, Z.Y.; HE, F. Effective viscosity of *Chlorella* sp. USTB-01 suspension for biofuel production. **Applied Mechanics and Materials**. Vols. 291-294, p. 316-319, 2013.

COLLING KLEIN, B.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 1376–1392, 2018.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005.

CORREA, V. H. C.; RAMOS, P. A precariedade do transporte rodoviário brasileiro para o escoamento da produção de soja do Centro-Oeste: Situação e perspectivas. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, vol.48, n.2, p.447-472, 2010.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738-2749, 2010.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VEILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DRAGONE, G.M.; FERNANDES, B.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. Third generation biofuels from microalgae in: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. 2nd ed. Badajoz: Formatex Research Center, 2010, p. 1355-1366.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B.; ABREU, A.; VICENTE, A.; TEIXEIRA, J. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011.

EPA. Determination of Trace Elements in Waters and Wastes Office of Research and Development. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington: American Public Health Association, 1994, 541 p.

EVANS, L.; HENNIGE, S.; WILLOUGHBY, N.; ADELOYE, A.; SKROBLIN, M.; GUTIERREZ, T. Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 24, part. A, p. 368-377, 2017.

FAROOQ, W.; LEE, Y.; RYU, B.G.; KIM, B.; KIM, H.; CHOI, Y.; YANG, J. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230-238, 2013.

FENG, P.; YANG, K.; XU, Z.; WANG, Z.; FAN, L.; QIN, L.; ZHU, S.; SHANG, C.; CHAI, P.; YUAN, Z.; HU, L. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 406-414, 2014.

FON SING, S.; ISDEPSKY, A.; BOROWITZKA, M.A.; MOHEIMANI, N.R. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 47–72, 2013.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; HAMLAOUI, S. Algas: **Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 332p.

FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; MARONEZE, M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 349–355, 2015.

FUENTES-GRÜNEWALD, C.; BAYLISS, C.; ZANAIN, M.; POOLEY, C.; SCOLAMACCHIA, M.; SILKINA, A. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 357-363, 2015.

GARCÍA-CUBERO, R.; MORENO-FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. How to combine CO₂ abatement and starch production in *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 32, 270-279, 2018.

GARCIA-MOSCOSO, J.L.; OBEID, W.; KUMAR, S.; HATCHER, P.G. Flash hydrolysis of microalgae (*Scenedesmus* sp.) for protein extraction and production of biofuels intermediates. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 82, p. 183-190, 2013.

GATENBY, C. M.; ORCUTT, D. M.; KREEGER, D. A.; PARKER, B. C.; JONES, V. A.; NEVES, R. J. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 1-11, 2003.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 259-270, 2017.

GOMES, N. A.; ALMEIDA, M. V. A.; MELO, M. C.; MONTEIRO, V. E. D.; OLIVEIRA, R. Influência de parâmetros físico-químicos na composição de constituintes tóxicos em lixiviado de aterro sanitário. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 3, 11 p., 2018.

GONZÁLEZ-DELGADO, Á. D.; BARAJAS-SOLANO, A. F.; ARDILA-ÁLVAREZ, A. M. Producción de biomasa y proteínas de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorellales: Chlorellaceae) a través del diseño de medios de cultivo selectivos. **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 18, n. 3, p. 451-461, 2017.

GUIEYSSE, B.; QUIJANO, G.; MUÑOZ, R. Airlift Bioreactors. **Comprehensive Biotechnology**. 2nd ed. New York: Elsevier, 2011. p. 199-212.

GUILLARD, R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum Press, 1975. p. 29-60.

GUIMARAES, C. P.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Estimativa do teor de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não-protéica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 41, n. 3, p. 365-375, 2005.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P.; MASSON, M. L. Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.225-231, 2009.

HATTAB, M. AL; GHALY, A. Microalgae Oil Extraction Pre-treatment Methods : Critical Review and Comparative Analysis. **Fundamentals of Renewable Energy and Applications**, v. 5, n. 4, p. 1-26, 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**, v. 203, p. 245–251, 2016.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; VELÁSQUEZ-ORTA, S.; NOVELO, E.; YÁÑEZ-NOGUEZ, I.; MONJE-RAMÍREZ, I.; LEDESMA, M.T.O. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 435–444, February, 2019.

HO, S. H.; HUANG, S.W.; CHEN, C.Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J.S. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 157-165, 2013.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v. 2, n. 4, p. 393-418, 1971.

HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921-3926, 2009.

HULTBERG, M.; JÖNSSON, H.L.; BERGSTRAND, K.J.; CARLSSON, A.S. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 465-467, 2014.

IEA, I. E. A. CO₂ Emissions from Fuel Combustion 2017 - Highlights. **International Energy Agency**, 526 p., 2017. Disponível em: <http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/file/CO2EmissionsfromFuelCombustionHighlights2017.pdf>. Acesso em: 03/10/2018

JARENKOW, A. **Estudo da produção e extração de lipídeos na microalga *Chlorella* sp.** 2014. 89 f., Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/109166>. Acesso em: 12 Ago. 2018.

KAERPINTONG, K.; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 288-295, 2007.

KHALILI, A.; NAJAFPOUR, G.D.; AMINI, G.; SAMKHANIYANI, F. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 2, p. 284-290, 2015.

KIM, D. G.; HUR, S. B. Growth and fatty acid composition of three heterotrophic *Chlorella* species. **Algae**, v. 28, n. 1, p. 101-109, 2013.

KINNUNEN, V.; CRAGGS, R.; RINTALA, J. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating-volume reactor. **Water Research**, v. 57, p. 247-257, 2014.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum* sp. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, p. 46-53, 2012.

KLINTHONG, W.; YANG, Y.H.; HUANG, C.H.; TAN, C.S. A Review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 15, n. 2, p. 712-742, 2015.

KUO, C. M.; JIAN, J.F.; LIN, T.H.; CHANG, Y.B.; WAN, X.H.; LAI, J.T.; CHANG, J.S.; LIN, C.S. Simultaneous microalgal biomass production and CO₂ fixation by cultivating *Chlorella* sp. GD with aquaculture wastewater and boiler flue gas. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 241-250, 2016.

LEITE, R. C. DE C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no brasil. **Novos Estudos - CEBRAP**, n. 78, p. 15-21, 2007.

LEONARDI, G.R.; CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compound**, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001.

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

LIN, L.; CHAN, G.Y.S.; JIANG, B.L.; LAN, C.Y. Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. **Waste Management**, v. 27, n.10, p. 1376-1382, 2007.

LIRA, R. A. **Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella minutissima* visando a obtenção de biocombustíveis**. 2011. 119f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011.

LIU, J.; ZHU, Y.; TAO, Y.; ZHANG, Y.; LI, A.; LI, T.; SANG, M.; ZHANG, C. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. **Biotechnol Biofuels**. v. 6, 11 p., 2013.

LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M.C.C.; FERNÁNDEZ, F.C.A.; BUSTOS, C.S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J.M.F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n.9, p. 7587-7591, 2010.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas. São Carlos: **RiMa**, 2006. 588 p.

MAGRO, FG; DECESARO, A; BERTICELLI, R.; COLLA, LM. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 37, n. 1, p. 159-174 2016.

MAIA, I. S.; RESTREPO, J.J.B.; CASTILHOS JUNIOR, A.B.; FRANCO, D. Avaliação do tratamento biológico de lixiviado de aterro sanitário em escala real na Região Sul do Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n. 4, p.665-675 2015.

MAKAREVICIENE, P. D. V.; ANDRULEVIČIŪTĖ, V.; SKORUPSKAITĖ, V.; KASPEROVIČIENĖ J. Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21-27, 2011.

MÄKELÄ, M. Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. **Energy Conversion and Management**, v. 151, p. 630–640, August, 2017.

MARKOU, G.; ICONOMOU, D.; MUYLAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 13, p. 79-84, 2016.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, n. 2, p. 60-79, 2008b.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.14, 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**, v. 81, p. 523-533, 2015.

MEIER, H.; REID, J.S.G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Loewus FA, Tanner W (eds) **Encyclopedia of plant physiology**. Plant carbohydrates I: intracellular carbohydrates. Springer, Berlin, v. 13, p. 418–471, 1982

MELO, R. R.; DEL MENEZZI, C. H. S. Comportamento Reológico da Madeira e Derivados. **Revista Ciência da Madeira - RCM**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 25-40, 2010.

MILANO, J.; ONG, H.C.; MASJUKI, H.H.; CHONG, W.T.; LAM, M.K.; LOH, P.K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180-197, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIN, M.; WANG, L.; LI, W.; MOHR, M.J.; HU, B.; ZHOU, W.; CHEN, P.; RUAN, R. Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 123-137, 2011.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 3, p. 323-328, 2007.

MOREIRA, J. B. et al. Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.33, n.3, p.691-698, 2016.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉ, K.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G.S.V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 493-506, 2017.

MORWEISER, M.; KRUSE, O.; HANKAMER, B.; POSTEN, C. Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1291-1301, 2010.

NAIR, A. T.; SENTHILNATHAN, J.; NAGENDRA, S. M. S. Application of the phycoremediation process for tertiary treatment of landfill leachate and carbon dioxide mitigation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 322-330, 2019.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 334 p., 2005.

OHSEI, S.; DERNER, R.B.; OZÓRIO, R.A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P. SANTOS. M. E. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1760-1767, 2009.

OJO, E. O.; AUTA, H.; BAGANZ, F.; LYE, G.J. Engineering characterisation of a shaken, single-use photobioreactor for early stage microalgae cultivation using *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 367-375, 2014.

OLIVIERI, G.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, p. 178-195, 2014.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W.A.; BÁLINT, P.; AREMU, A.O.; OKEM, A.; LOVÁSZ, C.; MOLNÁR, Z.; STADEN, J. Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. **Algal Research**, v. 16, p. 141-149, 2016.

PACHACAMA, L.; TIRADO, J.O.; DUCHICELA, J.; MAJUNATHA, B.; KUNDAPUR, R.R.; RAJESWARI, B. Evaluation of microalgae's (*Chlorella* sp. and *Synechocystis* sp.) pollutant removal property: Pig effluent as a live stock discharge. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 8, p. 135–141, 2016.

PELEGRINE, DHG; SILVA, MB; LOURES, CC. *Chlorella* sp microalgae suspensions - rheological behaviour analyzes at different culture times. **Preprints Energy & Fuels Technology**, 2016080041. Doi: 10.20944/preprints201608.0041.v1, 2016, 12 p.

PÉREZ-PAZOS, J. V.; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, P. Synthesis of neutral lipids in chlorella sp. under different light and carbonate conditions. **CTyF - Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 4, n. 4, p. 47-58, 2011.

POSTEN, C.; SCHAUB, G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 1, p. 64-69, 2009.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; AKBARSHA, M.A.; THAJUDDIN, N. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalgae *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 60-66, 2012.

QUEIROZ, L. M.; AMARAL, M.S.; MORITA, D.M.; YABROUD, S.C.; SOBRINHO, P.A. Aplicação de processos físico-químicos como alternativa de pré e pós-tratamento de lixiviados de aterros sanitários. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 4, p. 403-410, 2011.

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

RAPOSO, M. F. J.; OLIVEIRA, S. E.; CASTRO, P. M.; BANDARRA, N. M.; MORAIS, R. M. On the Utilization of Microalgae for Brewery Effluent Treatment and Possible Applications of the Produced Biomass. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 285-292, 2010.

RASTOGI, R. P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C.; MADAMWAR, D. Algal Green Energy – R&D and technological perspectives for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2946–2969, May, 2018.

RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444-467, 2013.

REIS, C.; LOURES, C.A.; CASTRO, H.F.; RÓS, P.; SANTOS, J.C.; FILHO, H.I.; SILVA, M.B. Microalgae Assisted Bioremediation of Landfill Leachate Using a Biocoil Reactor: Evaluation of Operational Conditions Using Taguchi Experimental Design. **British Journal of Environment and Climate Change**, v. 6, n. 4, p. 299–308, 2016.

RENGEL, A.; ZOUGHAIB, A.; DRON, D.; CLODIC, D. Hydrodynamic study of an internal airlift reactor for microalgae culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 117-129, 2012.

RIABI, H. R. A. Choosing the best microalgae and optimising its culture medium to produce more starch for medicinal use. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 12, n. 5, p. 06-11, 2018.

RICHARDS, R. G.; MULLINS, B. J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249, p. 59-67, 2013.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S.A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. 4, p. 394–404, 2018.

SALAMA, E. S.; KURADE, M.; ABOU-SHANAB, R.; EL-DALATONY, M.M.; YANG, I.; MIN, B.; JEON, B. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. 3, p. 1189–1211, 2017.

SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; MAEDA-MARTÍNEZ, A. N.; ACOSTA-GALINDO, S. Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*, **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 839-847, 2015.

SÁNCHEZ MIRÓN, A.; CAMACHO, F.G.; GÓMEZ, A.C.; GRIMA, E.M.; CHISTI, Y. Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. **AIChE Journal**, v. 46, n. 9, p. 1872–1887, 2000.

SCHMIDELL, W; LIMA, AU; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. 2. ed. São Paulo: Editora Blücher, 2001. 254 p.

SFORZA, E.; EMARA, M.K.A.; SHARIF, A. BERTUCCO, A. Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 373-378, 2015.

SHAMLOU, P. A.; TITCHENER-HOOKER, N. Turbulent aggregation and breakup of particles in liquids in stirred vessels. **Processing of Solid–Liquid Suspensions**. v. 1, p. 1-26, 1993.

SHARMA, S.K. MULVANEY, S.J. RIZVI, S.S.H. **Food processing engineering: theory and laboratory experiments**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2000. 348p.

SIAUT, M.; CUINÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTEIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11, 7 p., 2011.

SILVA, C. E. DE F.; SFORZA, E.; BERTUCCO, A. Continuous cultivation of microalgae as an efficient method to improve carbohydrate productivity and biochemical stability in: **CONFERÊNCIA E EXPOSIÇÃO EUROPÉIA DE BIOMASSA**, 25, Estocolmo, Suécia, 12-15 Junho, 2017. **Anais...**

SINGH, R.P.; HELDMAN, D.R. **Introduction to Food Engineering**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2003. 750 p.

SMITH, W. L. Culture of Marine Invertebrate Animals in **Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport**, 1, Springer, Boston, 1975. 331 p.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TAGLIAFERRO, G.V. **Cultivo da microalga *Chlorella minutíssima* 26a em modo batelada e contínuo em fotobiorreatores de tanque de bolhas e airlift: influência do meio de cultivo no crescimento e composição da biomassa**. 2017. 130 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

TAGLIAFERRO, G. V.; IZÁRIO FILHO, H.J.; CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S.; SILVA, M.B.; SANTOS, J.C. Continuous cultivation of *Chlorella minutissima* 26a in a tube-cylinder internal-loop airlift photobioreactor to support 3G biorefineries. **Renewable Energy**, v. 130, p. 439–445, 2019.

TAGUCHI, G.; RAFANELLI, A. J. **Taguchi on Robust Technology Development: Bringing Quality Engineering Upstream**. 1 st ed. Nova York: Editora ASME, 1993. 133 p.

TANGO, MD. **Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

TÁVORA, F. L. História e Economia dos Biocombustíveis no Brasil. Brasília: Centro de Estudos da Consultoria do Senado, **Texto para Discussão, n. 89**, Abr. 2011.

TERRY, K. L.; RAYMOND, L. P. System design for the autotrophic production of microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 474-487, 1985.

TIAN, X.; DAI, L.; LIU, M.; LIU, D.; DU, W.; WU, H. Lipase-catalyzed methanolysis of microalgae oil for biodiesel production and PUFAs concentration. **Catalysis Communications**, v. 84, p. 44–47, 2016.

TIGHIRI, H. O.; ERKURT, E. A. Biotreatment of landfill leachate by microalgae-bacteria consortium in sequencing batch mode and product utilization. **Bioresource Technology**, v. 286, p. 121396, 2019.

TISCHER, P.C.S. **Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus (gigartinales)***. 2006. 174f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4021–4028, 2008.

USLU, L.; ISIK, O.; KOÇ, K.; GÖKSAN, T. The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 386-389, 2011.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. DA. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como

parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu - SP. **Ecletica Quimica**, v. 22, p. 49-66, 1997.

VAN WYCHEN, S.; LAURENS, L. M. L. **Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass**; Golden: National Renewable Energy Lab, 2013. 11p.

VASSILEV, S. V.; VASSILEVA, C. G. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel**, v. 181, p. 1–33, 2016.

VENKATA SUBHASH, G.; ROHIT, M.V.; DEVI, M.P.; SWAMY, Y.V.; MOHAN, S.V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789-793, 2014.

VIEIRA, T. Q.; FERREIRA, W.B.; ARAÚJO, H.W.C.; CUNHA, T.H.C.S.; VIDAL, I.C.A.; MELO, D.J.N. Estudo da viabilidade do uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga chlorella sp visando a produção de biocombustíveis, **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 4, p. 62, 2013.

WANG, L.; MIN, M.; LI, Y.; CHEN, P.; LIU, Y.; WANG, Y.; RUAN, R. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1174-1186, 2010.

WANG, M.; KUO-DAHAB, W.C.; DOLAN, S.; PARK, C. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 131-137, 2014.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, Y. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13-20, 2009.

WILEMAN, A.; OZKAN, A.; BERBEROGLU, H. Rheological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 432-439, 2012.

WU, Z.; ZHU, Y.; HUANG, W.; ZHANG, C.; LI, T.; ZHANG, Y.; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 496-502, 2012.

XIA, M. L.; WANG, L.; YANG, Z.; CHEN, H. A novel digital color analysis method for rapid glucose detection. **Analytical Methods**, v. 7, p. 6654-6663, 2015.

XIANSHENG, N.; ZHENGGAN, Z.; XIONGWEY, W.; LUMING, L. The use of Taguchi method to optimize the laser welding of sealing neuro-stimulator. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 49, n. 3, p. 297–304, 2011.

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

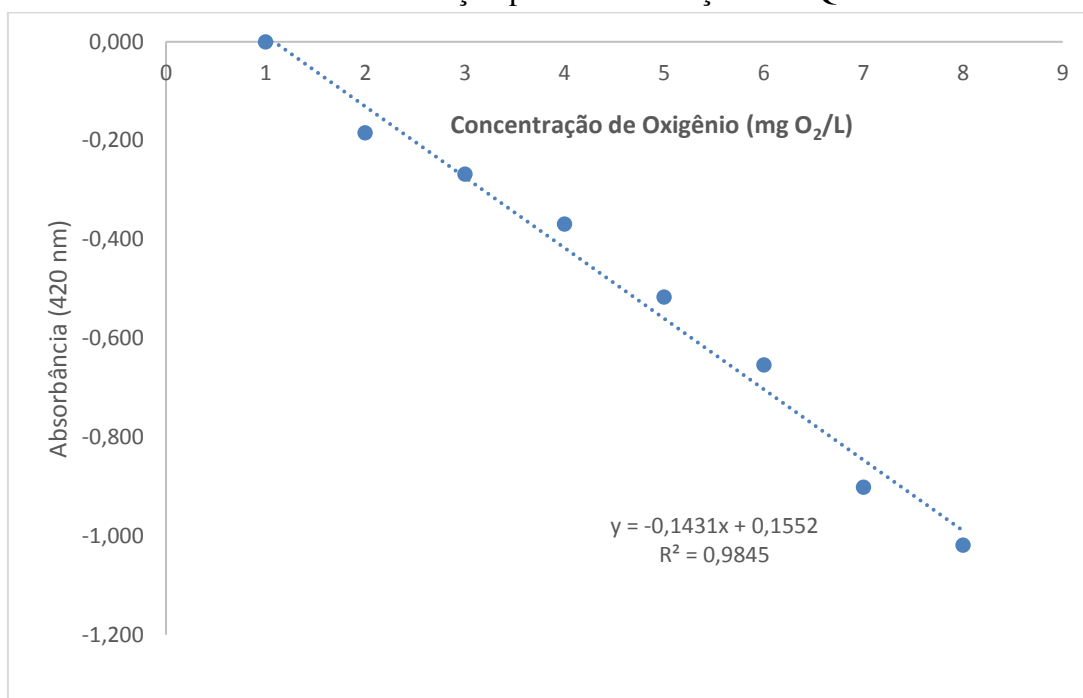
ZHAO, X.; ZHOU, Y.; HUANG, S.; QIU, D.; SCHIDEMAN, L.; CHAI, X.; ZHAO, Y. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 322-328, 2014.

ZHU, H.; KIM, Y. D.; DE KEE, D. Non-Newtonian fluids with a yield stress. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 129, n. 3, p. 177-181, 2005.

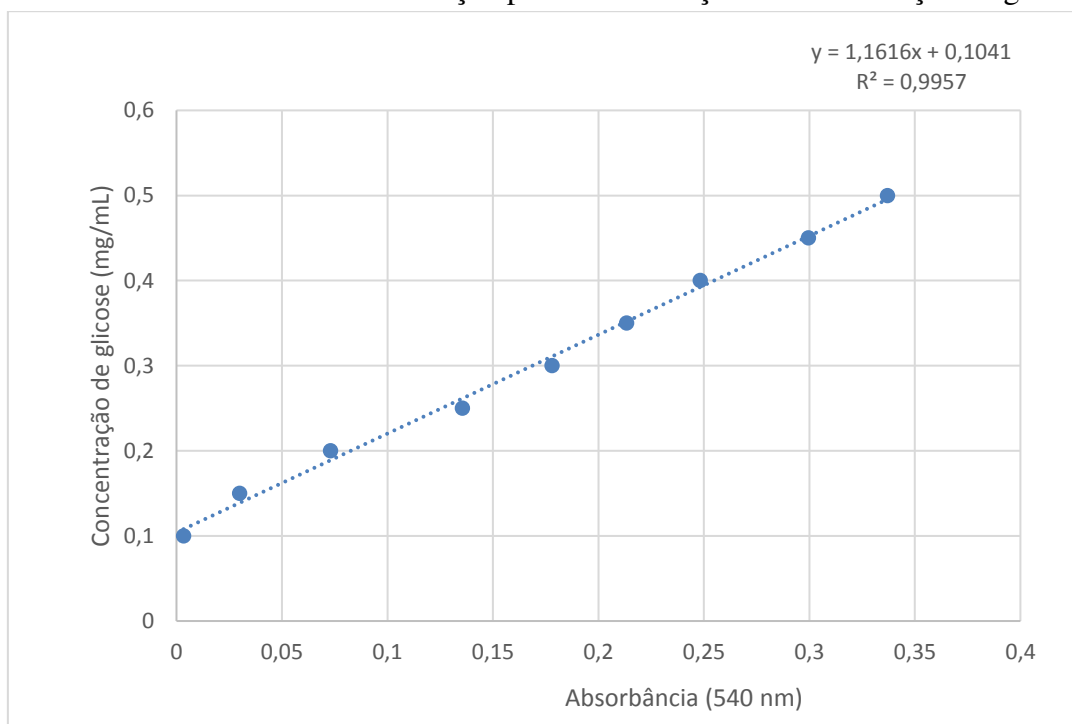
ZORN, S. M. F. E.; PEDRO, G.A.; AMARAL, M.S.; LOURES, C.C.A.; SILVA, M.B. Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídios da biomassa da microalga *Chlorella minutíssima* via solventes. **Holos**, v. 2, p. 66, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva de Calibração para determinação da DQO

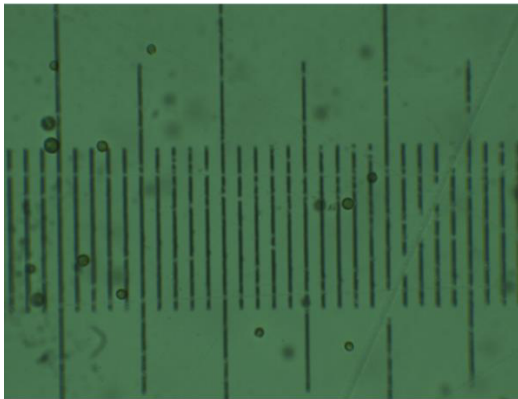


APÊNDICE B – Curva de Calibração para determinação da concentração de glicose.



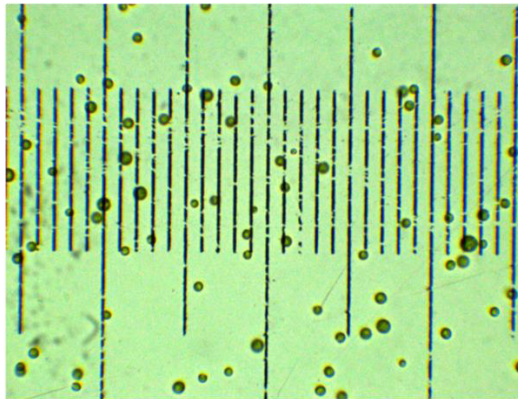
APÊNDICE C – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 1 – Semi-contínuo.

1º Dia



ESCALA
0 0,01
mm

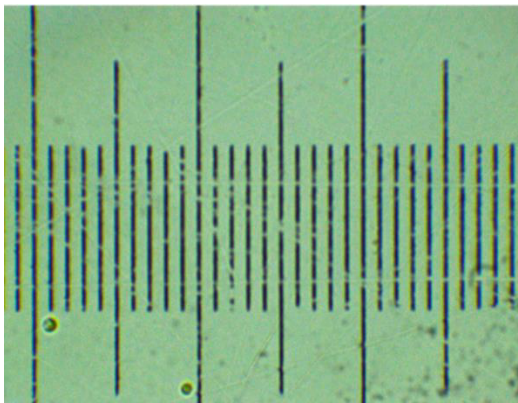
Último Dia



ESCALA
0 0,01
mm

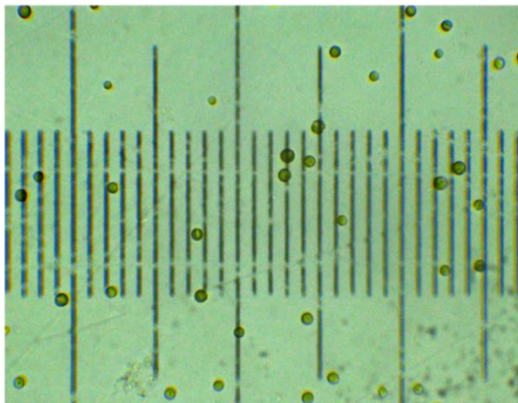
APÊNDICE D – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 2 – Semi-contínuo.

1º Dia



ESCALA
0 0,01
mm

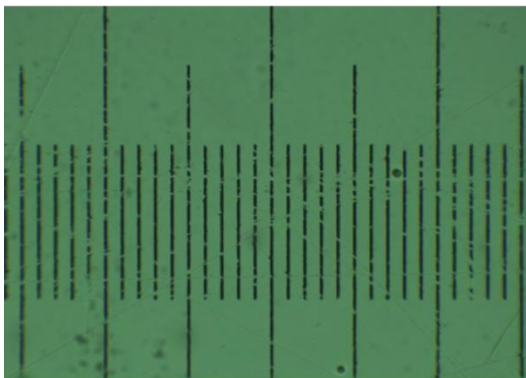
Último Dia



ESCALA
0 0,01
mm

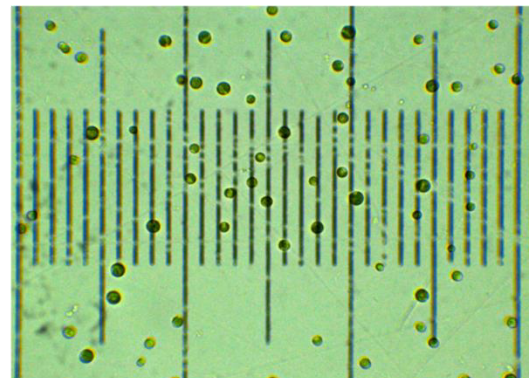
APÊNDICE E – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 3 – Semi-contínuo.

1º Dia



ESCALA
0 0,01
mm

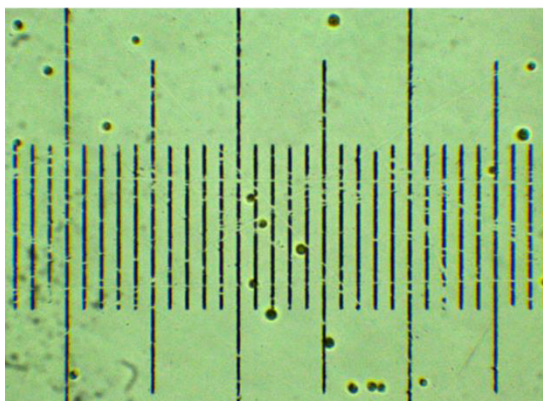
Último Dia



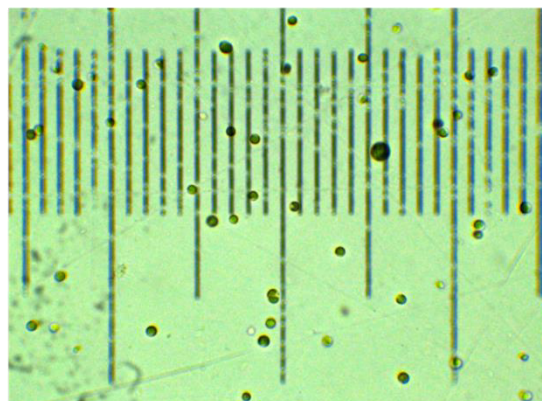
ESCALA
0 0,01
mm

APÊNDICE F – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 4 – Semi-contínuo.

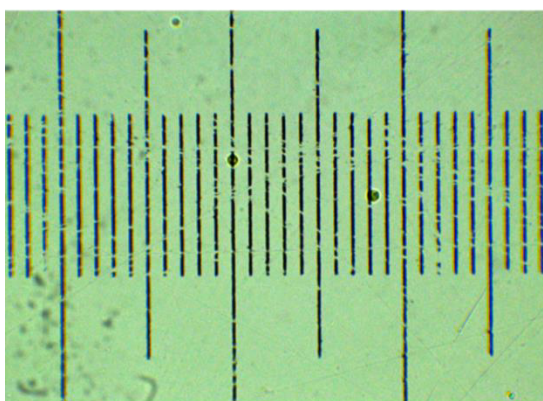
1º Dia

ESCALA
0 0,01
mm

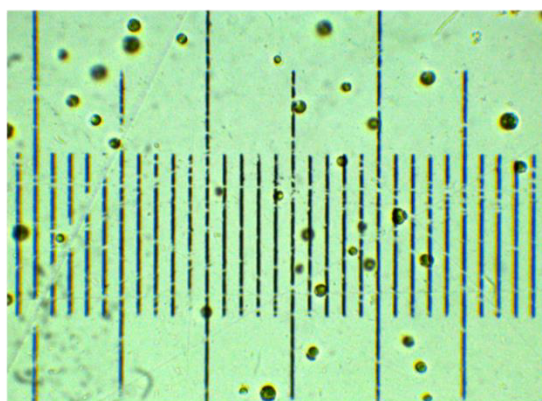
Último Dia

ESCALA
0 0,01
mm**APÊNDICE G** – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 5 – Semi-contínuo.

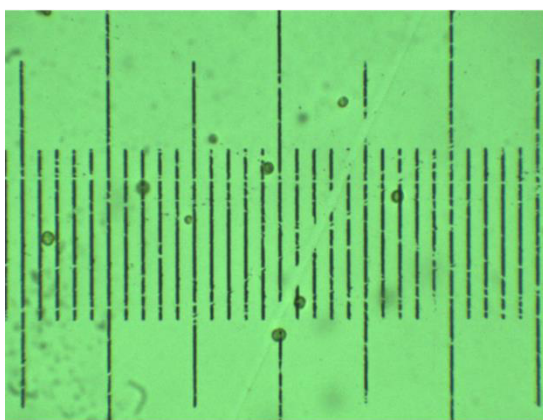
1º Dia

ESCALA
0 0,01
mm

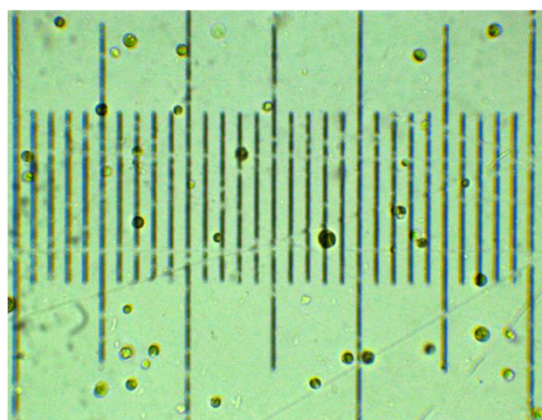
Último Dia

ESCALA
0 0,01
mm**APÊNDICE H** – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 6 – Semi-contínuo.

1º Dia

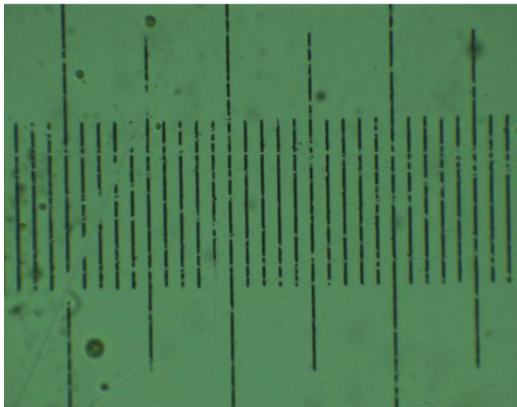
ESCALA
0 0,01
mm

Último Dia

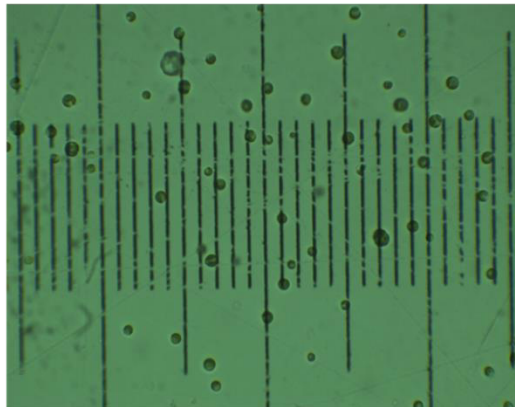
ESCALA
0 0,01
mm

APÊNDICE I – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 7 – Semi-contínuo.

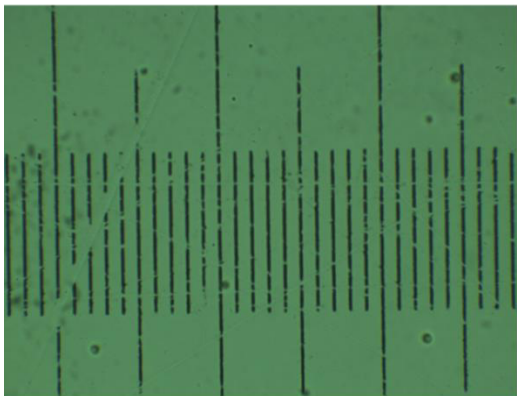
1º Dia

ESCALA
0 0,01
mm

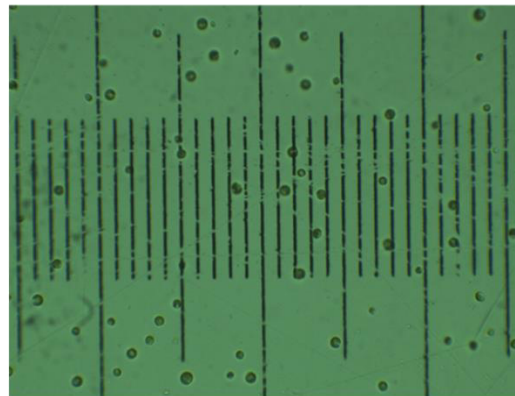
Último Dia

ESCALA
0 0,01
mm**APÊNDICE J** – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 8 – Semi-contínuo.

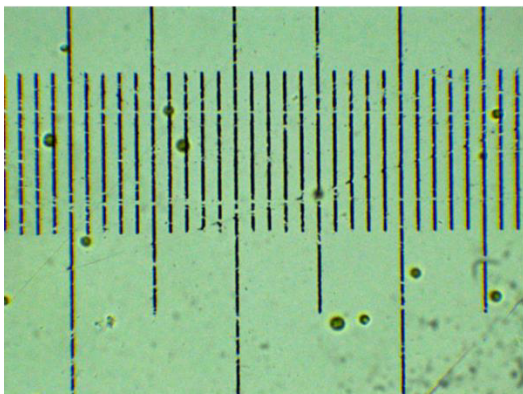
1º Dia

ESCALA
0 0,01
mm

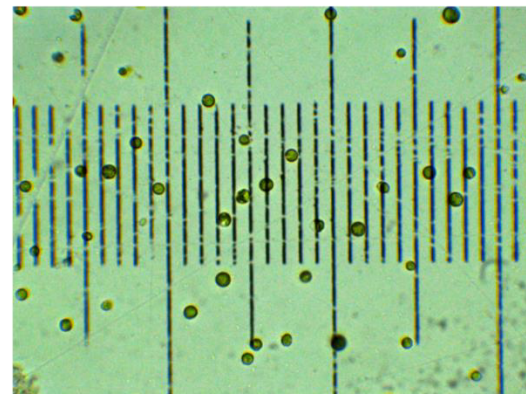
Último Dia

ESCALA
0 0,01
mm**APÊNDICE K** – Fotografia do primeiro e último dia da Condição 9 – Semi-contínuo.

1º Dia

ESCALA
0 0,01
mm

Último Dia

ESCALA
0 0,01
mm