

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

ALEXANDRE DE MORAES RICARDI

Análise dos efeitos das variáveis de processo na produção de biomassa e nos parâmetros reológicos da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em reator *Raceway* para produção de biocombustíveis

Lorena

2020



ALEXANDRE DE MORAES RICARDI

Análise dos efeitos das variáveis de processo na produção de biomassa e nos parâmetros reológicos da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em reator *Raceway* para 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. Dr. Messias Borges Silva

Versão Original

Lorena  
2020

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)

Ricardi, Alexandre de Moraes

Análise dos efeitos das variáveis de processo na produção de biomassa e nos parâmetros reológicos da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em reator Raceway para produção de biocombustíveis / Alexandre de Moraes Ricardi; orientador Messias Borges Silva - Versão Original. - Lorena, 2020.

138 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. 2020

1. Microalgas. 2. Reologia. 3. Chorume. 4. Raceway. 5. Biodiesel. I. Título. II. Silva, Messias Borges, orient.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, à Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Ofélia e Hércio, que sempre me deram força e suporte para seguir meus ideais.

À minha namorada Gabrielle, que me incentivou o tempo todo e me acompanhou de perto nessa fase da vida, sendo muito importante e fazendo tudo ficar mais fácil.

Ao meu filho Theodoro, que está vindo aí e foi fundamental nessa fase final de conclusão, me dando todo estímulo necessário pra não deixar a peteca cair.

Ao professor Dr. Messias, que foi mais que um orientador, sendo uma inspiração pra mim e pra muitos da área acadêmica.

À professora Dr<sup>a</sup> Daniela, que foi a principal responsável pelo início de tudo, além de todo suporte e confiança.

Ao professor Dr. Carlos Shigue, que me permitiu aprender ensinando com os projetos aplicados nas escolas públicas de Lorena, além do apoio e incentivo.

Aos meus irmãos, Amanda e Henrique, pela parceria e companheirismo.

Ao meu avô, Ademar, por todo apoio e carinho.

Aos meus amigos de Lorena: André, Augusto, Diogo, Matheus, Michel, Ph, Raquel, Simone, Tati, Thais, Thales e Ygormon pela amizade, pelas risadas e pelos bons momentos.

Aos meus amigos de Rep, Marcos e Trans, pela paciência e pela boa convivência.

Aos amigos do Lab de Microalgas: Carolzinha, Du, Gilberto, Guilherme, Wallyson e Júnia, pelo suporte e troca de experiência.

À Ana Beatriz, pela paciência, tranquilidade e disposição em me ajudar, pelas conversas e preocupação com todos os alunos do programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, que me possibilitou realizar esse trabalho.

À todos que, direta ou indiretamente, participaram e tornaram possível a conclusão desse trabalho.

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo, mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade”

*Walt Disney*





## RESUMO

RICARDI, A. M. **Análise dos efeitos das variáveis de processo na produção de biomassa e nos parâmetros reológicos da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em reator *Raceway* para produção de biocombustíveis.** 2020. 138p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Há algum tempo, as microalgas vêm despertando interesse nos cenários energético e ambiental. Sua elevada taxa de proliferação, a não necessidade de terras e de água previamente tratada para cultivo, além do amplo potencial de aproveitamento como fonte de biocombustíveis, no conceito das biorrefinarias, são vantagens que apontam para o sucesso desta pesquisa. O presente trabalho teve por objetivo analisar o comportamento reológico de suspensões da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em chorume (lixiviado de aterro sanitário), em reator *Raceway*, onde foram avaliados os efeitos dos fatores: concentração do chorume, concentração da fonte de carbono (acetato de sódio), vazão de aeração no reator e frequência de rotação do motor no agitador, utilizando planejamento de experimentos com o arranjo ortogonal de Taguchi L<sub>9</sub> para avaliar os efeitos desses quatro fatores nas seguintes variáveis de resposta: parâmetros reológicos; concentração, produção e produtividade de biomassa; teor e produtividade de lipídeos e redução da demanda química de oxigênio. Os resultados mostraram que o teor de acetato de sódio foi o fator que influenciou na maior quantidade de respostas analisadas no cultivo da microalga *Chlorella minutissima*, nas condições apresentadas. Pôde-se constatar a viabilidade de se utilizar o chorume no cultivo, exceto em altas concentrações, aliado ao baixo teor ou ausência da fonte de carbono. Com relação aos parâmetros reológicos, pôde ser observado comportamento de fluido dilatante, em todas as condições de cultivo e a vazão de aeração foi o fator que mais impactou nos resultados desta resposta.

**Palavras-chave:** Reologia. *Chlorella*. Chorume. *Raceway*. Biocombustíveis.

## ABSTRACT

RICARDI, A. M. **Analysis of the effects of process variables on the biomass production and rheological parameters of the microalgae *Chlorella minutissima* grown in Raceway reactor for biofuels production.** 2020. 138p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

For a while microalgae have been raising interest in energy and environmental scenarios. Its high proliferation rate, the no need for land and water previously treated for cultivation and the wide potential of use as a source of biofuels, in the concept of biorefinery, are advantages that point to the success of this research. This study had the objective of analyzing the rheological behavior of suspensions of the microalgae *Chlorella minutissima* cultivated in leachate (landfill leachate), in *Raceway* reactor, where the effects of the factors were evaluated: slurry concentration, carbon source concentration (sodium acetate), aeration in the reactor and frequency of motor rotation on the agitator using the design of experiments with orthogonal arrangement of Taguchi L<sub>9</sub> to evaluate the effects of these four factors on the following response variables: rheological parameters; biomass concentration, production and productivity; percentage and productivity of lipids and chemical oxygen demand reduction. The results showed that the sodium acetate content was the factor that influenced the greatest amount of responses analyzed in the cultivation of microalgae *Chlorella minutissima*, under the conditions presented. It was possible to verify the viability of using slurry in cultivation, except in high concentrations, combined with the low content or absence of the carbon source. Regarding the rheological parameters, dilating fluid behavior could be observed in all cultivation conditions and the aeration flow was the most impacting factor on the results of this response.

**Keywords:** Rheology. *Chlorella*. Slurry. *Raceway*. Biofuels.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Células da microalga <i>Chlorella minutissima</i> vista em microscópio biológico com aumento de 600 vezes. ....	27
Figura 2 - Exemplo de reatores para cultivo de microalgas: (a) Reator tubular espiral, (b) <i>Air Lift</i> e (c) <i>Raceway</i> . ....	30
Figura 3 - Diagrama simplificado do metabolismo das microalgas. ....	31
Figura 4 - Desenho esquemático de uma lagoa de cultivo em formato de pista ( <i>Raceway</i> ). .....	34
Figura 5 - Fotobiorreatores dos tipos (a) <i>Flat-Plate</i> e (b) coluna de bolhas.....	35
Figura 6 - Variação da biomassa pelo tempo em cultivo descontínuo. ....	41
Figura 7 - Tipos de comportamento de fluxo. ....	52
Figura 8 - Curvas de fluxo características para cada modelo matemático.....	53
Figura 9 - Células de <i>Chlorella minutissima</i> utilizadas no presente trabalho. ....	59
Figura 10 - Banco de células da microalga <i>Chlorella minutissima</i> no interior do cepário do Laboratório de Engenharia de Microalgas da Escola de Engenharia de Lorena .....	59
Figura 11 - Desenho representando as dimensões do reator tipo <i>Raceway</i> . ....	60
Figura 12 - Reator do tipo <i>Raceway Pond</i> utilizado nos cultivos.....	61
Figura 13 - Etapas da preparação do inóculo até o início dos cultivos em reator <i>Raceway</i> : a) cultivos em erlenmeyer no cepário. b) cultivo em recipiente transparente de 2L; c) cultivo em recipiente transparente de 5L; d) cultivo em reator <i>Raceway</i> . .....	62
Figura 14 - Fluxograma do procedimento de obtenção da biomassa seca.....	65
Figura 15 - Fluxograma da extração de lipídeos a partir da biomassa seca.....	66
Figura 16 - Comparação do crescimento diário da suspensão da microalga <i>Chlorella minutissima</i> pelo parâmetro da absorvância ( $\lambda=680\text{nm}$ ). ....	71
Figura 17 - Comparação do crescimento diário da suspensão da microalga <i>Chlorella minutissima</i> pelo parâmetro da concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ).....	72
Figura 18 - Comparação da obtenção de biomassa entre as diferentes condições de cultivo. .....	74
Figura 19 - Comparação da produtividade de biomassa entre as diferentes condições de cultivo. ....	76

Figura 20 - Comparação do teor de lipídeos obtido entre as diferentes condições de cultivo. .....	78
Figura 21 - Comparação da produtividade média de lipídeos entre as diferentes condições de cultivo.....	79
Figura 22 - Comparação da redução de DQO entre as diferentes condições de cultivo.....	81
Figura 23 - Gráfico comparativo da reologia entre todas as condições experimentais.....	82
Figura 26 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 3.....	83
Figura 29 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 6.....	83
Figura 25 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 2.....	83
Figura 28 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 5.....	83
Figura 27 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 4.....	83
Figura 24 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 1.....	83
Figura 30 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 7.....	84
Figura 32 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 9.....	84
Figura 31 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 8.....	84
Figura 33 - Gráfico da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento.....	87
Figura 34 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de concentração final do cultivo.....	90
Figura 35 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de concentração final do cultivo. ....	91
Figura 36 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de obtenção de biomassa total.....	94
Figura 37 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de obtenção de biomassa total.....	94
Figura 38 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de obtenção de biomassa total.....	97
Figura 39 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de obtenção de biomassa total.....	97
Figura 40 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de teor de lipídeos.	100
Figura 41 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de teor de lipídeos. ....	100
Figura 42 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de produtividade média de lipídeos.....	104

Figura 43 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de produtividade média de lipídeos. ....	104
Figura 44 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de redução de DQO. ....	107
Figura 45 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de redução de DQO. ....	107
Figura 46 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de redução de índice de consistência. ....	110
Figura 47 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de redução de índice de consistência. ....	110
Figura 48 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de índice de comportamento. ....	111
Figura 49 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de índice de comportamento. ....	112
Figura 50 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de tensão limite de escoamento. ....	113
Figura 51 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de tensão limite de escoamento. ....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtividade de biodiesel com diferentes matérias-primas (os valores para as microalgas são calculados a partir do teor em óleo). ....	28
Tabela 2 - Comparação da composição celular entre diferentes espécies de microalgas. ...	32
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo. ....	36
Tabela 4 - Comparação das produtividades de biomassa, lipídeos e ácidos graxos usando diferentes fontes de carbono durante cultivo em dois estágios. ....	40
Tabela 5 - Espécies produtoras de lipídeos e suas respectivas porcentagens em relação à biomassa seca. ....	45
Tabela 6 - Comparação entre os modelos reológicos. ....	52
Tabela 7 - Variáveis de entrada e níveis usados para determinação dos parâmetros significativos no cultivo da microalga <i>Chlorella minutissima</i> . ....	69
Tabela 8 - Arranjo ortogonal da matriz Taguchi L9. ....	70
Tabela 9 - Quantidade de biomassa obtida de 10 L de cultivo. ....	74
Tabela 10 - Produtividade de biomassa. ....	76
Tabela 11 - Teor de lipídeos ....	77
Tabela 12 - Produtividade média de lipídeos. ....	79
Tabela 13 - Análise de redução da Demanda Química de Oxigênio. ....	80
Tabela 14 - Comparação da confiança do ajuste entre os modelos matemáticos aplicados a análise reológica da suspensão da microalga <i>Chlorella minutissima</i> . ....	85
Tabela 15 - Parâmetros do modelo matemático Herschel-Bulkley para cada condição experimental de cultivo. ....	86
Tabela 16 - Matriz ortogonal da resposta em termos de obtenção de biomassa total dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais. ....	90
Tabela 17 - ANOVA para a média em termos de concentração final do cultivo. ....	91
Tabela 18 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de concentração final do cultivo. ....	92
Tabela 19 - Matriz ortogonal da resposta em termos de obtenção de biomassa total dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais. ....	93
Tabela 20 - ANOVA para a média em termos de obtenção de biomassa total. ....	95
Tabela 21 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de obtenção de biomassa total. ....	95

Tabela 22 - Matriz ortogonal da resposta em termos de produtividade de biomassa dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais. ....	96
Tabela 23 - ANOVA para a média em termos de produtividade de biomassa. ....	98
Tabela 24 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de produtividade de biomassa. ....	98
Tabela 25 - Matriz ortogonal da resposta em termos de teor de lipídeos dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais. ....	99
Tabela 26 - ANOVA para a média em termos de teor de lipídeos. ....	101
Tabela 27 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de teor de lipídeos. ....	101
Tabela 28 - Matriz ortogonal da resposta em termos de produtividade de lipídeos dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais. ....	103
Tabela 29 - ANOVA para a média em termos de produtividade média de lipídeos. ....	105
Tabela 30 - ANOVA para a razão sinal ruído em termos de produtividade média de lipídeos. ....	105
Tabela 31 - Matriz ortogonal da resposta em termos de redução de DQO dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais. ....	106
Tabela 32 - ANOVA para a média em termos de redução de DQO. ....	108
Tabela 33 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de redução de DQO. ....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CC	Concentração de Chorume (%)
CFC	Concentração da Fonte de Carbono (g.L <sup>-1</sup> )
DEQUI	Departamento de Engenharia Química
DOE	Design of Experiments (Planejamento de Experimentos)
DQO	Demanda Química de Oxigênio (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
FA	Frequência de agitação (rpm)
F	Teste F
GL	Graus de Liberdade
LED	Light Emitting Diode (Diodo emissor de Luz)
PB	Produtividade de biomassa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
PL	Produtividade média de lipídeos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
PVC	Polyvinyl Chloride (Policloreto de Vinila)
S/N	Razão Sinal-Ruído
SMQ	Soma Média Quadrática
SQ	Soma Quadrática
USP	Universidade de São Paulo
VA	Vazão de aeração (vvm)



## LISTA DE SÍMBOLOS

CO <sub>2</sub>	gás carbônico
m <sup>2</sup>	metro quadrado
m <sup>3</sup>	metro cúbico
L <sub>9</sub>	matriz ortogonal de Taguchi com 9 condições experimentais
µm	micrometro
cm	centímetro
pH	potencial hidrogeniônico
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	ácido carbônico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	íon bicarbonato
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	íon carbonato
H <sup>+</sup>	íon hidroxônio
H <sub>2</sub> O	água
OH <sup>-</sup>	íon hidroxila
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
g	gramas
L	litro
O <sub>2</sub>	oxigênio
°C	graus Celsius
N	nitrogênio
P	fósforo
ω3	ômega 3
ω6	ômega 6
C	carbono
mL	mililitro
GHz	giga hertz
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	íon dihidrogênio fosfato
HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	íon monohidrogênio fosfato
E	irradiância
CH <sub>4</sub>	metano
Ca <sup>+2</sup>	íon cálcio
Mg <sup>+2</sup>	íon magnésio
Na <sup>+</sup>	íon sódio

$K^+$	íon potássio
$NH^+4$	íon amônio
$Cl^-$	íon cloreto
$SO_4^{-2}$	íon sulfato
$Cd^{+2}$	íon cádmio
$Pb^{+2}$	íon chumbo
$Cr^{+3}$	íon cromo
$Cu^{+2}$	íon cobre
$\tau$	tensão de cisalhamento ( $dyn.cm^{-2}$ )
dyn	dina
$\gamma$	taxa de deformação ( $1.s^{-1}$ )
$\mu$	viscosidade (cP)
$n_{ap}$	viscosidade aparente (cP)
k	Índice de consistência (cP)
cP	centipoise
n	Índice de comportamento (adimensional)
w	watts
h	hora
mm	milimetro
nm	nanometro
NaCl	cloreto de sódio
v/v	razão volume por volume
$mm^2$	milimetro quadrado
$mm^3$	milimetro cúbico
rpm	rotações por minuto
M	molaridade ( $mol.L^{-1}$ )
mM	milimol
$\Delta t$	variação de tempo (dias)
L%	teor de lipídeos (%)
s	segundos
vvm	volume de ar por volume do meio de cultivo por minuto

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
1.1	Justificativa .....	24
1.2	Objetivos .....	25
1.2.1	Objetivo geral.....	25
1.2.2	Objetivos específicos .....	25
2	PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1	Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis.....	26
2.2	Metabolismo das Microalgas .....	31
2.3	Cultivo de microalgas .....	32
2.3.1	Tipos de reator .....	32
2.3.2	Principais parâmetros de cultivo .....	36
2.3.3	Crescimento e desenvolvimento das microalgas .....	40
2.3.4	Acompanhamento do crescimento das microalgas .....	42
2.3.5	Colheita da biomassa .....	42
2.3.6	Síntese de lipídeos em microalgas .....	44
2.3.7	Extração de lipídeos .....	46
2.4	Uso de efluentes no cultivo da biomassa microalgal .....	47
2.5	Reologia .....	50
2.5.1	Modelos reológicos.....	52
2.5.1.1	Modelo de Bingh am.....	53
2.5.1.2	Modelo de Ostwald Waale ou Lei da Potência .....	54
2.5.1.3	Modelo de Herschel-Bulkley .....	55
2.5.2	Fatores que influenciam na reologia das suspensões.....	55
2.6	Planejamento de Experimentos.....	56
2.6.1	Método de Taguchi .....	57
3	METODOLOGIA .....	59
3.1	Caracterização da microalga utilizada nos experimentos .....	59
3.2	O reator tipo <i>Raceway Pond</i> .....	60
3.3	Meio e condições experimentais para o crescimento da microalga <i>Chlorella minutissima</i> em reator do tipo <i>Raceway</i> . .....	61
3.3.1	Preparo do inóculo .....	62
3.3.2	Desenvolvimento dos cultivos .....	63

3.4	Acompanhamento do crescimento .....	63
3.5	Obtenção da biomassa.....	64
3.6	Extração de lipídeos .....	66
3.7	Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	67
3.7.1	Preparo das amostras.....	67
3.7.2	Digestão e medição da absorbância .....	68
3.7.3	Medição da absorbância.....	68
3.8	Análises reológicas.....	68
3.9	Planejamento Experimental .....	69
3.9.1	Análise Estatística .....	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.1	Crescimento celular dos cultivos .....	71
4.2	Biomassa .....	74
4.2.1	Quantificação da biomassa obtida.....	74
4.2.2	Produtividade de biomassa.....	75
4.3	Lipídeos.....	77
4.3.1	Teor de lipídeos.....	77
4.3.2	Produtividade média de lipídeos .....	78
4.4	Demanda química de oxigênio (DQO) .....	80
4.5	Reologia .....	81
4.5.1	Modelos matemáticos ajustados ao comportamento reológico da suspensão da microalga <i>Chlorella minutissima</i> cultivada em reator <i>Raceway</i> .....	84
4.5.2	Viscosidade Aparente.....	86
4.6	Análises Estatísticas .....	89
4.6.1	Crescimento celular dos cultivos .....	89
4.6.2	Biomassa total obtida .....	93
4.6.3	Produtividade de biomassa.....	96
4.6.4	Teor de lipídeos.....	99
4.6.5	Produtividade média de lipídeos .....	103
4.6.6	Demanda química de oxigênio.....	106
4.6.7	Reologia .....	109
	Índice de consistência .....	109
	Índice de comportamento (n).....	111

Tensão limite de escoamento .....	112
5 CONCLUSÕES .....	115
REFERÊNCIAS.....	116
ANEXOS .....	131
ANEXO A - Valores tabelados de $F_{\text{crítico}}$ para teste bilateral com $\alpha=0,05$ .....	131
ANEXO B - Caracterização do chorume proveniente do aterro sanitário do município de Cachoeira Paulista.....	132
ANEXO C - Comparação entre os valores de obtenção de biomassa e lipídeos cultivado em diferentes concentrações de nitrato de sódio e acetato de sódio. ....	133
APÊNDICES .....	134
APÊNDICE A - Caracterização metálica do chorume utilizado nos cultivos.....	134
APÊNDICE B - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 1. ....	134
APÊNDICE C - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 2. ....	134
APÊNDICE D - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 3. ....	135
APÊNDICE E - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 4. ....	135
APÊNDICE F - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 5.....	135
APÊNDICE G - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 6.....	136
APÊNDICE H - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 7.....	136
APÊNDICE I - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 8.....	136
APÊNDICE J - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 9. ....	137
APÊNDICE K - Resultado da análise de precipitação da biomassa diária (g).....	137
APÊNDICE L - Curva de calibração para obtenção da concentração da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	138
APÊNDICE M - Curva de calibração para a obtenção da concentração da suspensão microalgal do cultivo. ....	138



## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo de todo o século XX, os produtos do refino de petróleo tornaram-se a principal forma de geração de energia e a principal base para o desenvolvimento da indústria química, gerando uma dependência global deste combustível fóssil. Contudo, a crise suscitada pelo aumento do preço do barril petrolífero, na década de 1970, direcionou ao desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de fontes alternativas de energia (MARTÍN; GROSSMANN, 2012).

Concomitantemente, a crescente preocupação com questões ambientais tem se evidenciado nos últimos anos, passando a influenciar nas decisões dos dirigentes de empresas quanto às fontes energéticas. Dentro deste aspecto, os combustíveis fósseis são os mais criticados, devido à produção de CO<sub>2</sub> em quantidade que o planeta não tem condições de assimilar a longo prazo (causando o efeito estufa) e, também, pela possibilidade de emissão de óxidos de enxofre. Tais combustíveis pertencem à categoria não biodegradável e que, ao utilizá-los, emitem compostos poluentes à atmosfera (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012).

Nesse contexto, a bioenergia emerge como uma opção renovável com grande potencial de satisfazer às necessidades da sociedade moderna. Em outras palavras, as questões econômicas, geopolíticas e ambientais têm chamado a atenção do mundo para fontes alternativas de energia, em especial para os biocombustíveis onde os mais representativos desta classe - o biodiesel, resultado do processamento de lipídeos, e o bioetanol, originário da fermentação de carboidratos - apresentam processos produtivos estabelecidos. No Brasil, a produção desses biocombustíveis está perfeitamente consolidada sendo, basicamente, o biodiesel obtido a partir do óleo de soja e o bioetanol oriundo da cana-de-açúcar (DEMIRBRAS; BALAT, M.; BALAT, H., 2009).

Entretanto, a viabilidade no uso de um biocombustível está associada à economia de energia gerada por ele, destacando a importância em se fazer um balanço energético da sua cadeia produtiva, assim como da quantidade de gases de efeito estufa emitidos, incluindo as fases agrícola e industrial. Nesse aspecto, a produção do biodiesel proveniente da soja tem se mostrado uma boa opção apenas sob o ponto de vista econômico, mas ruim no que diz respeito ao balanço energético, à ocupação de terras e à inclusão social (a qual constitui um sério problema no Brasil). Além disso, dada à dimensão do território brasileiro, a exploração de outras fontes de matéria-prima para obtenção de biocombustíveis se faz necessária, onde a diversificação da matriz bioenergética caracteriza-se como uma nova oportunidade de

emprego e geração de renda. Diante disto, projetos experimentais realizados em todo o mundo têm destacado as microalgas como a única fonte de biocombustíveis, capaz de substituir a dependência do petróleo no futuro de forma econômica e socialmente viável (DEMIRBRAS, A.; DEMIRBRAS, M. F., 2011; SILVA; GOUVEIA; REIS, 2014).

Nos últimos anos, a obtenção de energia a partir das microalgas ganhou adeptos em muitas partes do mundo, como nos Estados Unidos e em diversos países europeus. O incentivo à utilização de microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis é decorrente dos grandes avanços da engenharia de biosistemas, mas que ainda apresenta grandes lacunas a serem otimizadas (MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2015; TIAN *et al.*, 2016). Nesse cenário, a construção de reatores que viabilize o cultivo das microalgas em grande escala e que permita maior controle sobre as condições operacionais destaca-se como um dos principais desafios, uma vez que os elevados custos de construção e operacionalidade dos fotobiorreatores são fatores limitantes para a sua utilização comercial, não apresentando condições para suportar de forma economicamente viável o cultivo em grande escala (HE; WANG; SONG, 2016; MAGRO *et al.*, 2016).

Ainda, segundo He, Wang e Song (2016), apesar do fato das microalgas possuírem 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 a produção de 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 (NECKEL; GOELLNER; BERTOLDI, 2016). No presente trabalho, o efluente utilizado no meio de cultivo como fonte de nutrientes foi o chorume (lixiviado de aterro sanitário), proveniente do aterro sanitário do município de Cachoeira Paulista. O aterro sanitário de Cachoeira Paulista-SP está localizado na Estrada Municipal Fiuta, Sítio Pai Joaquim, km 4, Bairro do Jardim. Suas atividades foram iniciadas em 16 de junho de 2006. A empresa responsável pelo aterro é a Vale Soluções Ambientais (VSA), que garante que o terreno disponibilizado para a atividade possui condições ideais de relevo e planialtimetria, perfazendo um total de 500 mil m<sup>2</sup>. Segundo André Luiz Galvão Rodrigues, gerente da unidade, o aterro de Cachoeira Paulista possui capacidade para receber 350 toneladas de resíduo por dia, sendo esses resíduos gerados pelas cidades de Lorena, Queluz, Canas, Guaratinguetá, Cachoeira Paulista, Aparecida, Lavrinhas, Potim, Cunha,



Caraguatatuba e São Sebastião. O chorume é coletado diariamente de uma lagoa com capacidade máxima de 210m<sup>3</sup> em caminhões com capacidade de armazenamento de 30m<sup>3</sup>.

O Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da Escola de Engenharia de Lorena/Universidade de São Paulo (EEL/USP) tem desenvolvido, ao longo dos anos, uma série de trabalhos científica e tecnologicamente relevantes. Com relação aos projetos envolvendo a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, os estudos têm englobado principalmente a “Otimização no cultivo de microalgas como fonte de matéria-prima para a produção do biodiesel”, onde está previsto a construção de um biorreator de alimentação contínua, sendo selecionado o sistema de alimentação mais conveniente, após análises físicas e químicas das correntes de alimentação. Numa linha de pesquisa desse tipo, o comportamento reológico ocupa posição de destaque, pois todos os materiais envolvidos no processo têm comportamento não-newtoniano e devem ser submetidos aos diversos tipos de operações unitárias como agitação, mistura, trocas de calor, movimentação por bombas especiais, separações e outras que podem advir da concepção e desenvolvimento de todo o processo.

Nesse contexto, foi proposto um terceiro projeto, com o objetivo de analisar o comportamento reológico de suspensões da microalga *Chlorella minutissima* em diferentes tempos de cultivo em reatores do tipo coluna de bolhas, submetido e aprovado pela Fapesp (Processo N. 2014/03244-0, concluído em outubro de 2016), sob o título de “Análise do comportamento reológico de suspensões de *Chlorella minutissima* ao longo das diversas etapas para a produção do biodiesel”.

De acordo com os resultados obtidos nos trabalhos mencionados nos parágrafos anteriores, o cultivo em chorume intensificou a taxa do crescimento microalgal, sem a necessidade de adição de sais, conferindo baixo custo ao processo. Paralelamente, a biomassa microalgal cultivada no meio Guillard apresentou comportamento não-newtoniano e tal comportamento, aliado ao fato dessas suspensões apresentarem estruturas complexas, demanda que, paralelamente às medidas reológicas, a biomassa seja caracterizada com relação à configuração, quantidade, tamanho e distribuição das partículas dispersas, por meio de um microscópio biológico.

Considerando a escassez de informações à respeito de dados reológicos de comportamento de suspensão de microalgas na literatura científica e sabendo que esta informação é um conhecimento chave de suma importância para se projetar um reator que atenda as condições necessárias para o aumento de escala e, ainda, que os fotobiorreatores não demonstram ser capazes de suprir tal necessidade, o presente trabalho tem como objetivo

analisar o comportamento reológico de suspensões da microalga *Chlorella minutissima*, cultivada em chorume, em reator *Raceway*, para diferentes tempos e condições de processo, assim como a configuração, quantidade, tamanho e distribuição das partículas dispersas na biomassa. Para tal, foram avaliados os efeitos da concentração do chorume (2,5%; 5,0% e 7,5%), da concentração de fonte de carbono (acetato de sódio) ( $0\text{g.L}^{-1}$ ;  $1\text{g.L}^{-1}$  e  $2\text{g.L}^{-1}$ ), vazão da aeração no reator (0,05vvm; 0,10vvm e 0,15vvm) e da frequência de rotação do agitador (4rpm, 6rpm e 8rpm).

O comportamento reológico da suspensão da microalga *Chlorella minutissima* foi analisado diariamente durante os períodos de cultivo, por meio do reômetro giratório Brookfield (LVDV-3T). As partículas suspensas foram caracterizadas com relação à configuração, quantidade, tamanho e distribuição, por meio de um microscópio biológico trinocular acoplado com câmera digital.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O uso do chorume como fonte de nutrientes e minerais no cultivo de microalgas torna o processo mais barato, já que o uso de vitaminas e demais nutrientes de forma pura encarece o processo, tornando-o assim, inviável em escalas maiores, como na *Raceway*. Deste modo, propõe-se o uso do chorume, que contém grande parte do que é necessário ao cultivo, e, se necessário, suplementado com nutrientes que estejam em falta na sua composição. A realização de experimentos, no qual são avaliadas o comportamento das respostas ao variar as condições de entrada (fatores controlados) é de extrema importância para o entendimento do processo e no auxílio de tomada de decisão de maneira eficaz. A utilização do planejamento de experimentos, a partir do arranjo ortogonal de Taguchi, visa colaborar para a viabilidade da pesquisa, reduzindo de forma considerável a quantidade de tempo e recursos gastos. Com os resultados obtidos, através deste estudo, o aumento de escala torna-se possível, visto que a maior limitação para o procedimento é a falta de conhecimento do comportamento do processo e de como controlar as variáveis inerentes a ele. Ainda, em relação aos resultados, existem poucos estudos abordando reologia de suspensão de microalgas, principalmente se restringirmos o assunto a grandes reatores de cultivo, como é o caso da *Raceway*.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Analisar o comportamento reológico de suspensões da microalga *Chlorella minutissima*, cultivada em chorume, em reator *Raceway*, para diferentes condições de processo, assim como a configuração, quantidade, tamanho e distribuição das partículas dispersas na biomassa e encontrar a melhor condição de cultivo para cada parâmetro de resposta analisado, através da matriz experimental do arranjo ortogonal de Taguchi L<sub>9</sub>.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Derivados do objetivo geral, o presente trabalho teve outras metas a serem alcançadas:

- Realizar análises como: acompanhamento diário do crescimento do cultivo, análises reológicas, análise de demanda química de oxigênio, obtenção da biomassa e extração de lipídeos;
- Utilizar o chorume como fonte de nutrientes e minerais ao cultivo, visando diminuir os custos de produção e permitir o aumento da escala produtiva;
- Avaliar a eficácia do tratamento de efluentes promovido pelo cultivo de microalgas, através dos valores de redução de DQO;
- Testar a consistência do arranjo ortogonal de Taguchi.

## 2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROALGAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA BIOCOMBUSTÍVEIS

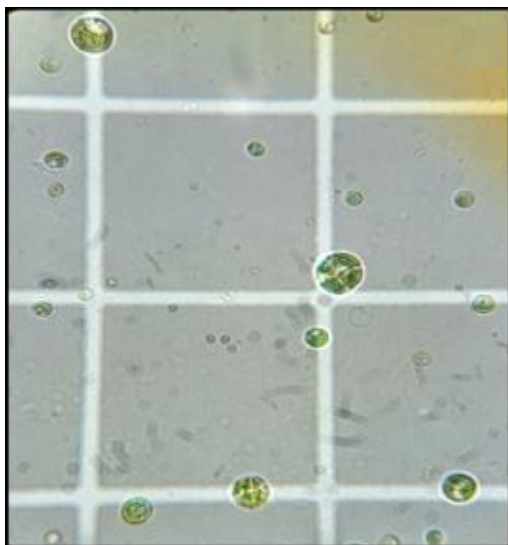
As microalgas são pequenos organismos fotossintéticos encontrados em ambientes aquáticos (água salgada ou doce). A ausência de estruturas (caule e folhas), aliada ao fato de encontrarem-se submersas em água, tornam as microalgas mais eficientes na conversão de energia solar em biomassa, quando comparadas às plantas superiores (SCHENK *et al.*, 2014).

Por volta de 1919 iniciou-se culturas propriamente ditas com algas, sendo a espécie *Chlorella sp.* a pioneira nesse sentido, verificando-se que certas algas podiam duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia conter 50% de proteína crua (BORZANI *et al.*, 2001). As células de *Chlorella* podem ter de 2 a 12 µm de diâmetro, são unicelulares, microscópicas, esféricas, ovoides ou elipsoidais, podendo ocorrer em água doce, salgada e solos. O cloroplasto é parietal, em forma de “taça”, podendo apresentar ou não um pirenoide (GRAHAM; WILCOX, 2002; SHUBERT, 2003), encontrada comumente em lagos, com grande habilidade de realizar fotossíntese (VONSHAK, 1997). Sua composição média é de aproximadamente 20% de gordura, 45% de proteína, 20% de carboidrato e 10% de minerais e vitaminas (PHUKAN *et al.*, 2011). A reprodução é principalmente assexuada sendo realizada pela formação de quatro autoesporos. A reprodução sexuada é desconhecida (GRAHAM; WILCOX, 2002).

Microrganismos como a *Chlorella sp.* (família Oocystaceae), são unicelulares, de águas continentais, com ampla distribuição geográfica e capazes de gerar elevada quantidade de biomassa sob determinadas condições de cultivo (SIPAÚBA-TAVARES; PELICONE; OLIVEIRA, 2009; MOHAN *et al.*, 2009).

Ainda, segundo Sipaúba-Tavares, Pelicone e Oliveira (2009) e Mohan *et al.* (2009), dentre as microalgas mais utilizadas para produção de biomassa destacam-se os organismos da Classe *Chlorophyceae*, os quais apresentam diversos membros com altas taxas de divisão celular (tempo de geração curto). Alguns representantes das famílias *Oocystaceae* (*Chlorella minutissima*. (Figura 1) e *Selenastraceae* (*Ankistrodesmus sp.*)) são exemplos típicos de microalgas, unicelulares, com ampla distribuição geográfica e que geram elevadas quantidades de biomassa em curtos intervalos de tempo.

Figura 1 - Células da microalga *Chlorella minutissima* vista em microscópio biológico com aumento de 600 vezes.



Fonte: (TAGLIAFERRO, 2017).

O crescente interesse no estudo de microrganismos como microalgas deve-se à sua aplicação comercial em diferentes campos tecnológicos, como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras (AMIN, 2009; XIA; ZHANG, HU, 2011). Além destas, as microalgas estão despertando interesse no cenário energético e ambiental por apresentarem amplo potencial de aproveitamento, devido ao rápido crescimento, a elevada eficiência de conversão fotossintética, ao elevado teor e capacidade de acúmulo de lipídeos e carboidratos, a produção não sazonal e a possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para culturas alimentares. Tais vantagens tornaram esses microrganismos promissores substratos para a produção de combustíveis, sendo o biodiesel o mais explorado, visto que algumas espécies de microalgas têm elevado teor lipídico, podendo produzir até 137000 litros de óleo por hectare, ao ano, em condições ótimas (POHNDORF *et al.*, 2016).

O aspecto econômico de produção de microalgas vem mudando com o passar do tempo. Primeiramente, seu uso era focado para a área alimentar, logo após surgiram estudos para obtenção de compostos para serem utilizados na química fina, na fabricação de biomateriais, aplicações na agricultura, medicina, tratamento de água e esgoto, bioabsorção de metais pesados, biofertilização e condicionador de solos para o setor agrário. Porém, recentemente, seu maior foco de utilização está voltado para o setor energético, na obtenção de biocombustíveis (REIS; GOUVEIA, 2013).

Atualmente, as microalgas são consideradas a fonte de matéria-prima que tem o maior potencial para substituir os combustíveis fósseis. A produção de óleo de microalgas é muitas vezes superior a de plantas oleaginosas, como a palma, o amendoim e a mamona. Para se cultivar essa biomassa não são usados solos agrícolas, elas auxiliam na absorção do dióxido de carbono e, também, podem ser utilizadas no tratamento de efluentes (FRANCO, 2011).

A composição química das microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídeos. A concentração dos componentes é variável de espécie para espécie. Na fabricação do biodiesel, a matéria prima necessária é o lipídeo, que se encontra na forma de triglicerídeo, sendo que os ácidos graxos presentes nas microalgas podem estar dispostos em cadeias curtas e longas e os de cadeia curta são os ideais para a produção deste biocombustível (CHISTI, 2007).

Nesse contexto, os biocombustíveis a partir de microalgas são uma alternativa atrativa (ZHANG *et al.*, 2010) devido a sua rápida razão de crescimento, alta concentração de lipídeos, pouca ocupação territorial - em comparação com as demais fontes de biocombustíveis - e elevada absorção de CO<sub>2</sub> (JORQUERA *et al.*, 2010; SINGH; OLSEN, 2011). A Tabela 1 apresenta dados que diferenciam as diversas matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel.

Tabela 1 - Produtividade de biodiesel com diferentes matérias-primas (os valores para as microalgas são calculados a partir do teor em óleo).

<b>Matéria-Prima</b>	<b>Teor de Óleo (% m.m<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade em Óleo (L.ha<sup>-1</sup>.a<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área Necessária (m<sup>2</sup>.ano<sup>-1</sup>.Kg<sub>biodiesel</sub><sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade em Biodiesel (Kg.ha<sup>-1</sup>.a<sup>-1</sup>)</b>
<b>Milho</b>	44	172	66	152
<b>Soja</b>	18	636	18	562
<b><i>Jatropha</i></b>	28	741	15	656
<b><i>Camelina</i></b>	42	915	12	809
<b>Girassol</b>	40	1070	11	946
<b>Palma</b>	36	5366	2	4747
<b>Microalga (teor reduzido de óleo)</b>	30	58700	0.2	51927
<b>Microalga (teor médio de óleo)</b>	50	97800	0.1	86515
<b>Microalga (teor elevado de óleo)</b>	70	136900	0.1	121104

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

De acordo com Monteiro e Mota (2013), os biocombustíveis podem ser classificados de acordo com a matéria prima utilizada na sua produção, sendo:

- Os biocombustíveis de primeira geração, aqueles cujo processo produtivo encontra-se bem desenvolvido e são produzidos a partir de matérias-primas de origem alimentícia, como o milho e a soja. A grande desvantagem de sua produção seria a competição entre o uso do alimento para fonte de combustível, aumentando o preço do alimento e seus derivados.
- Os biocombustíveis de segunda geração, aqueles que utilizam como matéria-prima a biomassa lignocelulósica, podendo esta se originar a partir dos resíduos agrícolas e do processamento da madeira, utilizando óleos de vegetais que não são comestíveis, como o óleo da semente de tabaco e tem como principal problema a sazonalidade da colheita da matéria prima e a falta de abundância da matéria prima.
- Os biocombustíveis de terceira geração, aqueles originados de biomassa cultivada para este propósito e que não tenha nenhuma competição com a produção de alimentos, como as algas. Como mostrado na Tabela 1, as microalgas tem maior produtividade de óleo se comparada a outras matérias-primas, além de outras vantagens, como: necessitar de uma área menor para ser produzida e de não ser um alimento.

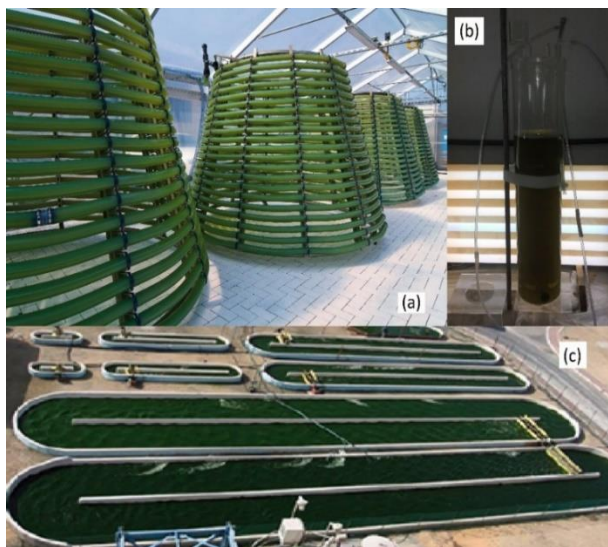
Segundo Huntley e Redalje (2007), o gênero *Chlorella* é considerada uma candidata promissora para a produção comercial de lipídeos devido ao seu rápido crescimento e fácil cultivo, destacando a *Chlorella sp.* como uma das espécies mais robustas para o cultivo em tanques abertos devido ao seu potencial de resistir a contaminações, visto que há uma contaminação considerável nesses tipos de tanque, pelo fato de ficarem expostos a atmosfera.

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

Pereira *et al.*, (2012), afirma que a produção destes organismos autotróficos é realizada em sistemas iluminados, tais como os fotobiorreatores (sistemas fechados) ou as lagoas fotossintéticas (sistemas abertos) e, para que a taxa de crescimento e a produtividade sejam mais elevadas, as microalgas necessitam de condições de cultivo adequadas. Ainda, segundo os autores, os principais arranjos dos reatores abertos são os tanques retangulares e circulares

do tipo *Raceway*; nos sistemas fechados normalmente empregam-se reatores do tipo coluna de bolhas, *Air Lift* e arranjos tubulares espirais (Figura 2) .

Figura 2 - Exemplo de reatores para cultivo de microalgas: (a)Reator tubular espiral, (b)*Air Lift* e (c)*Raceway*.



Fonte: (a)(KOLLER, 2015), (b) O autor, (c)(HATTAB; GHALY, 2015).

De acordo com Singh e Dhar (2011), os principais parâmetros que influenciam na produção da biomassa microalgal incluem a intensidade de luz, a concentração do  $\text{CO}_2$ , a quantidade de nutrientes e as condições de mistura. No que diz respeito às condições de mistura, para que a taxa de crescimento e a produtividade da biomassa sejam elevadas, um sistema de agitação adequado é imprescindível, de modo a manter as células em suspensão, proporcionar uma exposição uniforme de luz em todas as células, aumentar a transferência de massa para reduzir o gradiente de nutriente na cultura e para evitar sedimentação das células. No entanto, o aumento do cisalhamento pelo fornecimento excessivo de energia pode produzir danos celulares, afetando o desempenho da cultura (BENNEMANN; OSWALD, 1996; MAGRO *et al.*, 2016).

No desenvolvimento de novos projetos industriais, como é o caso do cultivo de microalgas em larga escala para geração de biocombustíveis, a análise do comportamento reológico do material é de fundamental importância nos cálculos de engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos tais como bombas, tubulações, misturadores, aeradores, trocadores de calor, dentre outros (PELEGRINE; SILVA; GASPARETTO, 2002; SILVA; PELEGRINE; GASPARETTO, 2005).

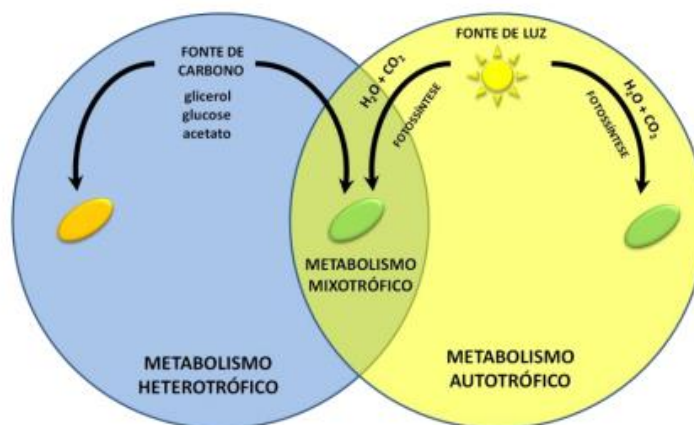


De acordo com os resultados obtidos por Lira (2011) e Pelegrine, Silva e Loures (2016), os cultivos microalgais não apresentam valores constantes de viscosidade ao longo das diferentes etapas do processo e, para otimizá-las, torna-se necessário cautelosa análise do comportamento reológico dos cultivos em cada uma destas etapas.

## 2.2 METABOLISMO DAS MICROALGAS

O metabolismo da microalga pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. No autotrófico, a geração de energia necessária para a sobrevivência da célula é regida pela fotossíntese. No heterotrófico são adicionados nutrientes e outros compostos orgânicos como fonte de carbono (por exemplo: glicose e/ou acetato), que são dissolvidos no meio de cultivo, para que o metabolismo ocorra na ausência de luz. E por último, no cultivo mixotrófico ocorre a atuação de ambos os metabolismos citados anteriormente (MORAIS, 2011; KAEWPINTONG *et al.*, 2007; TERRY; RAYMOND, 1985; BOROWITZKA, 1999; KIM; HUR, 2013). A *Chlorella minutissima* é um exemplo de microalga que possui a capacidade de se adaptar aos três tipos de metabolismo (CHEN *et al.*, 2011; TERRY; RAYMOND, 1985). Os tipos de metabolismo estão representados esquematicamente na Figura 3.

Figura 3 - Diagrama simplificado do metabolismo das microalgas.



Fonte: (MARIANO, *et al.*, 2010).

Estudos com microalgas estão sendo realizados nos mais diversos campos, devido a sua composição e flexibilidade metabólica. Alguns exemplos, são: tratamento de águas residuais, detoxificação biológica e remoção de metais pesados, como bioindicadores para

detecção de substâncias, entre outros. Os cultivos heterotróficos e mixotróficos vem sendo empregados nos meios de cultivo empregando efluentes (RAMSUNDAR *et al.*, 2017; RAZZAK *et al.*, 2017; REYIMU; OZÇIMEN, 2017; SINGH; TIWARI; DAS, 2016). Ainda, o cultivo mixotrófico, apresenta vantagens, como: rápido crescimento e elevado rendimento em biomassa e teor de lipídeos, tornando bastante interessante para produção de biodiesel (MITRA; VAN LEEUWEN; LAMSAL, 2012; HEREDIA-ARROYO *et al.*, 2011)

Além dos lipídeos, as microalgas possuem outros metabólitos de valor agregado, como por exemplo, carboidratos, proteínas e pigmentos que podem ser refinados e comercializados com diferentes aplicações. Dentre as principais espécies de microalgas cultivadas hoje no mundo, estão a *Chlorella sp.* e *Spirulina sp.*, utilizadas com a finalidade principal de suplementação alimentar; a *Dunaliella salina*, que é boa fonte de caroteno e a *Haematococcus pluvialis*, cultivada com o objetivo de produção de astaxantina (AZEREDO, 2012). A composição celular média de algumas espécies de microalgas pode ser observada na Tabela

Tabela 2 - Comparação da composição celular entre diferentes espécies de microalgas.

<b>Espécies</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lipídeos</b>
<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 maxima</i>	60-71	13-16	6-7

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

## 2.3 CULTIVO DE MICROALGAS

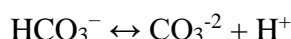
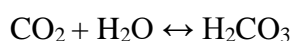
### 2.3.1 Tipos de reator

As microalgas podem ser cultivadas de diferentes formas, que são divididas basicamente em dois grandes grupos: cultivos abertos e fechados.

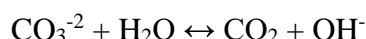
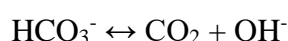
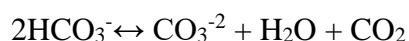
### a) Sistema de cultivo aberto

As lagoas fotossintéticas são fotobiorreatores abertos, com profundidade variando de 10 a 50cm aproximadamente, de modo que permita a difusão de dióxido de carbono proveniente da atmosfera e a penetração da luz solar (CHISTI, 2007).

A absorção de CO<sub>2</sub> da atmosfera através da superfície de uma *Raceway* é absolutamente insuficiente para suportar a fotossíntese. Uma fonte de CO<sub>2</sub> é necessária para evitar a limitação de carbono e atingir alta produtividade de biomassa. Segundo Weissman, Tillet e Goebel (1989), entre 35 e 70% do CO<sub>2</sub> injetado para um *Raceway* é perdido para a atmosfera, se traduzindo em uma perda monetária significativa. Se o dióxido de carbono for consumido rapidamente e não repostado, o pH torna-se alcalino. Quando o CO<sub>2</sub> é injetado no meio de cultivo, ele pode ser encontrado na forma de 4 espécies: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>. Seguem as seguintes equações de equilíbrio:



Como pode-se perceber, existe um acúmulo de íons H<sup>+</sup>, fazendo com que o pH do meio de cultivo diminua (LEKANG, 2007). No entanto, o consumo do dióxido de carbono pelas microalgas é dado pelas seguintes reações (RICHMOND, 2004):



É possível ver que há, no decorrer do cultivo, uma acumulação de íons OH<sup>-</sup>, levando a um aumento gradual do pH. Caso não haja biomassa suficiente para absorver o CO<sub>2</sub> injetado no meio de cultivo, o pH ficará mais ácido (LOURENÇO, 2006).

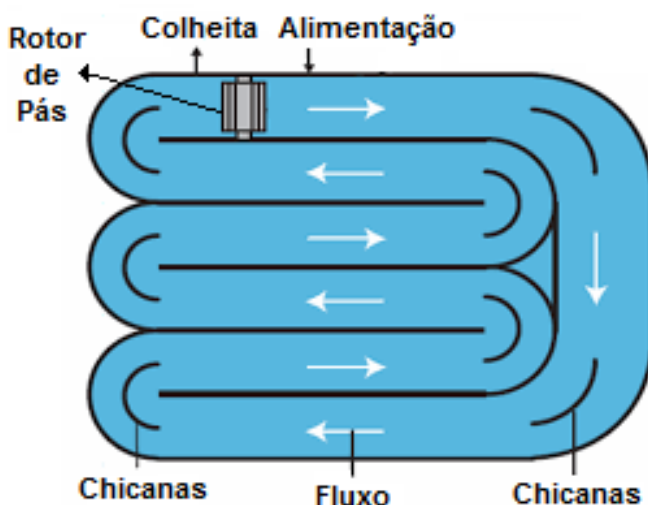
Um aumento do pH durante os períodos de pico de fotossíntese é comumente visto nestes sistemas de cultivo (BECKER, 1994). Um pH alcalino não é desejado, uma vez que resulta na geração de amônia. Esta dissolve-se a partir de sais de amônio e isto inibe a produtividade de algas. O crescimento em meio alcalino pode não ser possível para as algas oceânicas, como a *Chlorella sp.*, uma vez que os sais marinhos se precipitam a valores de pH inferiores a 8 (CHISTI, 2012). Na maioria dos casos, o CO<sub>2</sub> fornecido é realmente absorvido pela alga sob a forma de bicarbonato. Segundo Jeon *et al.* (2016), existem enzimas

que convertem o  $\text{NaHCO}_3$  em  $\text{CO}_2$  e vice-versa e Hou *et al.* (2016) e Kim *et al.* (2017), elucidam a vantagem do uso do bicarbonato em relação ao  $\text{CO}_2$ , que apresenta baixa solubilidade no meio e, por isto, em grande parte é perdido para a atmosfera, assim, isto, faz com que o uso do  $\text{NaHCO}_3$  torne-se mais conveniente em relação ao suprimento de  $\text{CO}_2$  gasoso.

Os *Raceways Ponds* (Figura 4) são sistemas pouco sofisticados, onde as microalgas ficam expostas ao contato direto com a atmosfera, são cultivadas sob condições naturais de iluminação e temperatura e com baixo ou nenhum controle dos parâmetros ambientais. Esses tanques, geralmente, possuem 30cm de profundidade e são construídos de concreto, fibras de vidro, policarbonato com fundo de terra ou revestidos com material plástico. Nestes tanques ocorre uma recirculação em circuito fechado. Essas culturas são constantemente agitadas com pás mecânicas para evitar a sedimentação das partículas, sendo utilizado para a produção de microalgas das espécies: *Spirulina*, *Chlorella*, *Arthrospira platensis*, *Anabaena sp.*, *Nannochloropsis* e *Dunaliella* (DERNER *et al.*, 2006; PEREIRA, *et al.*, 2012; JORQUERA *et al.*, 2010; CHISTI, 2007).

A agitação de culturas, em meio líquido, mantém as células em suspensão e evita parcialmente a sua deposição no fundo do biorreator, favorecendo a homogeneização de disponibilidade de luz a todas as células em suspensão e promovendo a eliminação de excesso de oxigênio dissolvido no meio, o que diminui o risco de ocorrer morte celular por fotooxidação (BECKER, 2004).

Figura 4 - Desenho esquemático de uma lagoa de cultivo em formato de pista (*Raceway*).



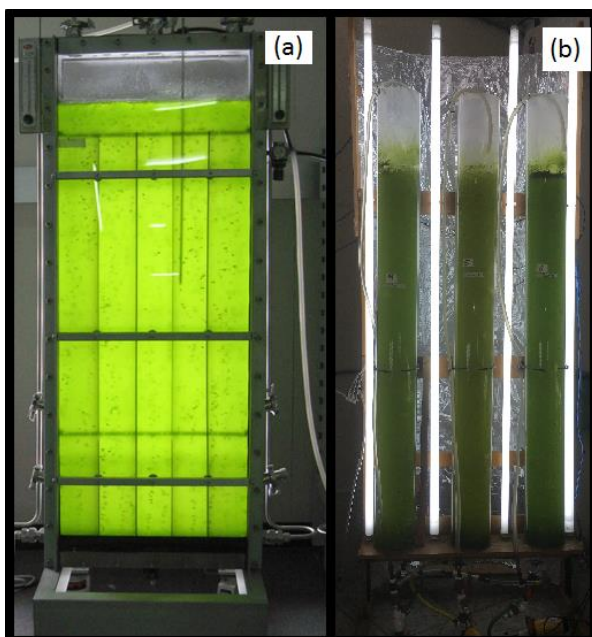
Fonte: (JORQUERA, 2010).

O sistema aberto apresenta grandes vantagens, como: o baixo custo de investimento de operação e possibilidade de *scale up*. A produção de microalgas em lagoas abertas não compete por espaço com culturas agrícolas, podendo ser alocada em terras e locais não-agricultáveis. Ainda, exigem menor energia na produção, tem fácil manutenção e limpeza e o seu potencial de produção de energia líquida é elevado, o que favorece na produção de biocombustíveis. Porém, sua maior limitação está na dificuldade em conseguir controlar o processo e na vulnerabilidade a contaminação por outras algas ou protozoários, que podem inviabilizar a produção (BRENNAN; OWENDE, 2010).

### b) Sistema de cultivo fechado

Os sistemas fechados, também denominados fotobiorreatores, tem como principais características o maior controle das variáveis de processo. São, geralmente, construídos de acrílico ou vidro para uma melhor penetração da luz, melhorando a eficiência da fotossíntese. Há o controle da iluminação e da intensidade da iluminação. Seu meio é esterilizado, o que evita contaminação de outros microrganismos e é possível se controlar a vazão de ar e CO<sub>2</sub>, permitindo uma maior produtividade ao adaptar o meio de cultivo para otimizar o processo de acordo com a microalga escolhida. Dentre os tipos de fotobiorreatores, os mais usados são: *flat-plate* e coluna de bolhas ou tubulares (Figura 5).

Figura 5 - Fotobiorreatores dos tipos (a) *Flat-Plate* e (b) coluna de bolhas.



Fonte: O autor.

A Tabela 3 apresenta as vantagens e desvantagens entre os sistemas aberto e fechado.

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo.

<b>Parâmetros</b>	<b>Sistema Aberto</b>	<b>Sistema Fechado</b>
<b>Risco de Contaminação</b>	Muito Alto	Baixo
<b>Necessidade de Área</b>	Alta	Baixa
<b>Perda de Água</b>	Muito Alta	Muito Baixa
<b>Perda de CO<sub>2</sub></b>	Alta	Muito Baixa
<b>Variedade de Espécies Cultiváveis</b>	Poucas	Alta, quase todas
<b>Flexibilidade de Produção</b>	Nenhuma	Alta
<b>Reprodutibilidade dos Parâmetros de Produção</b>	Específicas do Local	Possível
<b>Padronização</b>	Nenhuma	Possível
<b>Dependência do Clima</b>	Absoluta	Insignificante
<b>Período até produção líquida ser alcançada após o início ou interrupções</b>	Longo	Curto
<b>Concentração de Biomassa</b>	0.1 – 0.5 g.L <sup>-1</sup>	2 – 8 g.L <sup>-1</sup>
<b>Eficiência nos Processos Downstream</b>	Baixa, grande volume com baixas concentrações	Alta, volumes menores com altas concentrações

Fonte: (PULZ, 2001).

### 2.3.2 Principais parâmetros de cultivo

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). Os fatores biológicos incluem os fatores reprodutivos da própria espécie, a taxa metabólica e as interações entre as espécies, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal. Quanto aos fatores físico-químicos, que afetam o crescimento das microalgas, são principalmente reportados estudos sobre a luz, a temperatura, a salinidade e a disponibilidade de nutrientes (HELLENBUST, 1970; GUILLARD, 1975; EPPLEY, 1977; YONGMANITCHAI; WARD, 1991, LOURENÇO; MARQUES Jr., 2002; BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007).

Segundo Gladue (1991), a maioria das espécies algais é fotoautotrófica, isto é, através da fotossíntese obtém energia da luz para fixar carbono, necessário para a construção de biomassa.

Fatores como temperatura, luz e nutrientes não afetam somente a taxa fotossintética e a produtividade em biomassa das microalgas, tais fatores afetam também o metabolismo

celular e por consequência a composição celular (VONSHAK, 1997). O principal componente de interesse nas microalgas para a produção de biodiesel é o lipídeo, que segundo Suali e Sarbatly (2012) pode atingir altas porcentagens na biomassa pela manipulação do método de cultivo. A cultura de microalgas requer um controle rigoroso de todos os fatores de crescimento: nutrientes, pH, temperatura, concentração de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, e luz. Para otimizar o crescimento é necessário compreender o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições:

- Nutrientes (suplementação): Segundo Lourenço (2006), os nutrientes podem ser subdivididos em três categorias, apresentando as seguintes características:
  - Macronutrientes: Apresentam as funções de constituir a estrutura de biomoléculas, membranas e do meio intracelular, participar do processo de troca de energia, regular atividades metabólicas, dentre outras funções de grande importância. Carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício e ferro são os principais macronutrientes presentes em células vivas;
  - Micronutrientes: Participam da estrutura e atividade de diversas enzimas. Por exemplo, o molibdênio (Mo) é necessário para a assimilação do nitrogênio. O cobalto (Co) é requerido nas microalgas que sintetizam vitamina B<sub>12</sub>. Manganês, molibdênio, cobalto, boro, vanádio, zinco, cobre e selênio são os principais micronutrientes presentes em células vivas;
  - Vitaminas: As vitaminas que são usualmente adicionados aos meios de cultivos são: Tiamina (B<sub>1</sub>), que possui função geral de agir como coenzima, Biotina (B<sub>7</sub>), que atua no transporte de CO<sub>2</sub> e Cianocobalamina (B<sub>12</sub>), que não possui ainda um papel metabólico suficientemente elucidado.
- Luz: A luz é um fator importante no cultivo, visto que as microalgas são seres fotossintetizantes. No cultivo de microalgas, a demanda por luz aumenta com o passar do tempo. Dessa forma, uma correta suplementação de luz é necessária para um crescimento adequado das microalgas. Uma alta suplementação luminosa na fase inicial de crescimento pode causar foto-inibição (SOARES, 2010).
- Aeração: A aeração dos cultivos, também é um fator limitante, pois impede que as células sedimentem, mantendo-as em suspensão. Além disso, o sistema permanece homogêneo e todas as células são expostas as mesmas condições de cultivo. Essa aeração pode ser realizada por um sistema de agitação mecânica (pás) em sistemas abertos, sistema de bombas, reciclo e distribuição de bolhas pelo reator fechado. A

aeração também ajuda no processo de respiração microbiana, deixando o meio homogêneo facilita a dissociação do O<sub>2</sub> no meio facilitando a troca de gases do microorganismo com o meio. (BORZANI *et al.*, 2001).

- Temperatura: O crescimento celular e a porcentagem lipídica são fortemente afetados pela temperatura. Dependendo da espécie, ao aumentar a temperatura observa-se o aumento no teor de lipídeos (VERMA *et al.*, 2010). Microalgas do gênero *Chlorella* são boas produtoras de lipídeos quando cultivadas a temperaturas entre 25 a 30°C, embora sejam capazes de crescer em temperaturas a partir de 16°C (SUALI; SARBATLY, 2012).

Nos cultivos em batelada as células são inoculadas no meio fresco no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior de nutrientes.

A composição do meio de cultivo é de suma importância para o bom desenvolvimento das microalgas. Dentre os nutrientes adicionados, destaca-se a importância da fonte de nitrogênio. Sabe-se de longa data na literatura, que o acúmulo de lipídeos no interior das células das microalgas pode ser ampliado em ambientes de cultivo com escassez de nitrato (ABEDINI NAJAFABADI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; RASDI; QIN, 2015; SAN PEDRO *et al.*, 2014; SUNG *et al.*, 2017). A composição bioquímica das microalgas está relacionada à integração de vários processos envolvidos na absorção e assimilação de nutrientes. Por exemplo, a deficiência de certos nutrientes poderá levar a uma maior absorção destes no meio (BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001). Quando o meio possui limitação de nitrogênio (N), algumas microalgas reagem com aumento nos teores de lipídeos ou carboidratos, havendo um decréscimo na síntese de proteínas (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000; RICHMOND, 2004). A rota de produção de proteínas, neste caso, é desviada para produção dos outros dois componentes celulares. A célula responde à deficiência como um período de escassez do nutriente e direciona o metabolismo para acúmulo de material de reserva (GROBBELAAR, 2004). O teor de fósforo (P) disponível para as microalgas também pode provocar diferentes respostas na produção de componentes celulares. Em *Ankistrodesmus falcatus* a limitação deste nutriente aumentou a produção de lipídeos e carboidratos e diminuiu a síntese de proteínas (KILHAN *et al.*, 1997). Segundo Rasdi e Qin (2015), a relação de nitrato e fosfato (N:P) influencia a taxa de crescimento e a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Ainda, no mesmo estudo, os autores verificaram que uma proporção de 120:1 de N:P aumenta o teor de determinados ácidos



graxos poli-insaturados nas células da microalga *Nannochloropsis oculata*. San Pedro *et al.* (2014), por outro lado, verificaram que a limitação na concentração de fosfato no meio não influencia de forma tão significativa na produção de biomassa e de lipídeos, quanto comparada à limitação de nitrato.

Além da fonte de nitrogênio, também existe a necessidade da escolha da fonte de carbono, assim como a determinação da quantidade desta fonte a ser disponibilizada. Conforme a natureza da fonte de carbono empregada, o cultivo da microalga é classificado como: autotrófico, mixotrófico ou heterotrófico, como já mencionado anteriormente. O cultivo autotrófico ocorre quando apenas fontes inorgânicas de carbono (especialmente CO<sub>2</sub>) são empregadas, sob iluminação constante ou não, de modo que a microalga obtém energia através da luz e faz fotossíntese (GROBBELAAR, 2004). O bicarbonato também é uma fonte de carbono empregada em regimes autotróficos, uma vez que existem enzimas que transformam bicarbonato em CO<sub>2</sub> e vice versa (JEON *et al.*, 2016). No cultivo mixotrófico, por sua vez, ocorre à fotossíntese, pois é fornecido CO<sub>2</sub> e iluminação, porém também é fornecida uma fonte orgânica de carbono (glicose, acetato, melão e glicerina, por exemplo). Por fim, no cultivo heterotrófico é fornecida a fonte de carbono, porém não ocorre fotossíntese, pois o cultivo é realizado no escuro (GROBBELAAR, 2004). A escolha da fonte de carbono tem forte influência sobre o crescimento celular, acúmulo de lipídeos e na produção de  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 das microalgas (ABEDINI NAJAFABADI *et al.*, 2015; CHEIRSILP; TORPEE, 2012; LI *et al.*, 2016; SELVAKUMAR; UMADEVI, 2014; WOODWORTH *et al.*, 2015). Em um de seus trabalhos, Abedini Najafabadi *et al.* (2015), avaliaram o efeito do uso de diversos tipos de fontes de carbono (orgânicas e inorgânicas) na produção celular, acúmulo de lipídeos e produção de ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*. Dentre as fontes de carbono testadas, o uso de acetato de sódio, em um cultivo com baixa concentração de nitrato, foi o que apresentou o maior teor de lipídeos. Ainda, observaram que o acetato de sódio, o bicarbonato de sódio e o melão são fontes de carbono que propiciaram altos teores de ácido  $\alpha$ -linoleico (um dos ácidos graxos poli-insaturados do tipo  $\omega$ 3). Na Tabela 4, estão presentes os dados do estudo de Abedini Najafabadi *et al.* (2015), no qual fizeram um cultivo em dois estágios (estágio I com quantidade suficiente de nitrogênio e estágio II com falta de nitrogênio) e compararam a influência das fontes de carbono: ar, CO<sub>2</sub>, bicarbonato de sódio e acetato de sódio nos seguintes parâmetros: concentração e produtividade de biomassa, quantidade e produtividade de lipídeos e quantidade e produtividade de ácidos graxos:

Tabela 4 - Comparação das produtividades de biomassa, lipídeos e ácidos graxos usando diferentes fontes de carbono durante cultivo em dois estágios.

	Ar	3% CO <sub>2</sub>	Acetato de Sódio	Bicarbonato de Sódio
Tempo (dia)	8	7	6	6
Concentração de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	1,083 ± 0,042	1,366 ± 0,048	1,176 ± 0,015	1,250 ± 0,066
Produtividade de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	0,093 ± 0,005	0,146 ± 0,007	0,139 ± 0,002	0,151 ± 0,011
Quantidade Final de Lipídeo (%)	25,86 ± 2,84	36,75 ± 0,81	42,5 ± 1,93	36,31 ± 2,00
Produtividade de Lipídeo (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	23,94 ± 0,06	53,76 ± 0,22	59,11 ± 0,19	54,96 ± 0,88
Quantidade de Ácidos Graxos (%)	2,496 ± 0,260	5,971 ± 0,0696	7,613 ± 0,852	5,500 ± 0,406
Produtividade de Ácidos Graxos (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	2,31 ± 0,05	8,73 ± 0,19	10,59 ± 0,09	8,32 ± 0,18

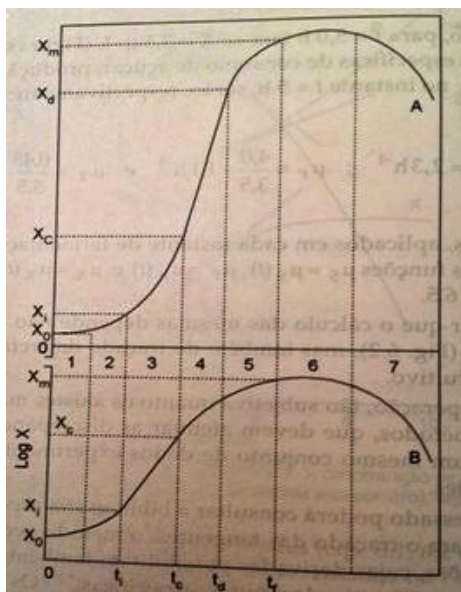
Fonte: (ABEDINI NAJAFABADI, *et al.*, 2015).

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

### 2.3.3 Crescimento e desenvolvimento das microalgas

Considera-se um meio de cultura líquido com uma fonte de energia adequada, os nutrientes necessários, condições químicas e físicas favoráveis em sistema fechado (exceto a troca de gases). Se uma população de organismos for inoculado, pode-se obter uma curva (Figura 6), que mostra as várias fases características do crescimento de populações microbianas, ao seguir o seu crescimento ao longo do tempo (RICHMOND, 2004).

Figura 6 - Variação da biomassa pelo tempo em cultivo descontínuo.



Fonte: Adaptado de (BORZANI *et al.*, 2001)

Tomando como referência as numerações do gráfico, as fases são (RICHMOND, 2004):

1 - Fase de adaptação (*fase lag*): trata-se de um período de adaptação das células extraídas de uma cultura em fase exponencial ou estacionária para um meio fresco; esta fase é extensa na presença de tóxicos, de nutrientes dificilmente metabolizáveis ou se o inóculo for de reduzida dimensão ou inadequado.

2 - Fase de aceleração do crescimento: trata-se de um período onde as células já estão adaptadas e começam a multiplicar-se; a taxa específica de crescimento é inferior ao valor máximo.

3 e 4 - Fases de crescimento exponencial: fase de crescimento acelerado onde o valor da taxa específica de crescimento se mantém constante, atingindo o seu valor máximo.

5 - Fase de desaceleração do crescimento: nesta fase a concentração de um (ou mais) nutriente(s), tornar-se-á limitante, com o conseqüente decréscimo da taxa específica de crescimento.

6 - Fase estacionária: As populações raramente conseguem manter um crescimento exponencial a altas velocidades durante um largo período de tempo, visto que o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pelo acúmulo de produtos inibitórios do metabolismo. Como conseqüência a velocidade de crescimento diminui e iguala a taxa de morte. A população de microrganismos mantém, durante algum tempo, uma concentração

aproximadamente constante de biomassa à custa da utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido à lise de outras células.

7 - Fase de morte: A morte resulta do esgotamento de nutrientes da cultura de microrganismos. A cinética de morte é também equivalente a uma reacção de primeira ordem.

#### **2.3.4 Acompanhamento do crescimento das microalgas**

Em um cultivo descontínuo de microalgas, o tempo de crescimento pode variar de acordo com as condições impostas, sendo que o acompanhamento do desenvolvimento celular faz-se essencial para determinar o momento ótimo para coleta da biomassa formada. Os principais métodos utilizados para acompanhar o crescimento celular é a contagem de células por microscopia e a medida da densidade óptica por espectrofotometria (LOURENÇO, 2006).

Ainda, segundo Lourenço (2006), a contagem direta por microscopia é a técnica mais simples e tradicional para monitorar o crescimento de microalgas, por intermédio de uma câmara de contagem, como por exemplo, uma câmara de Neubauer. Um número de células algáceas presentes em um determinado volume é contado com o auxílio de um microscópio biológico com capacidade de aumento de pelo menos 400 vezes. Nas contagens em microscópio, a densidade de indivíduos é geralmente expressa como o número de células por mililitro de cultivo. Já o crescimento de microalgas pelo uso da densidade óptica se baseia na obstrução física da luz pelas células, quanto mais células estiverem presentes na amostra maior será a absorção de luz e menor será a passagem da luz pela amostra. Utiliza-se um espectrofotômetro para realizar as medições de um cultivo de microalgas num comprimento de onda de 680nm.

#### **2.3.5 Colheita da biomassa**

Um dos grandes impasses na comercialização das microalgas é o alto custo da colheita da biomassa, chegando, em alguns casos, a 30% do custo do processo (GUDIN; THERPENIER, 1986). Por isso, é importante que existam pesquisas cujo foco é justamente esta etapa.

Após o período de cultivo, deve-se proceder com a colheita da biomassa microalgal, que é considerada por muitos a etapa chave para a produção industrial de biocombustíveis a partir de óleos de microalgas. Isso se deve ao fato delas crescerem em culturas muito diluídas, o que faz necessário o processamento de grandes quantidades de líquidos para a sua colheita, desprendendo alto consumo energético (LEE; LEWIS; ASHMAN, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

A colheita é basicamente uma separação sólido-líquido entre a biomassa e meio de cultivo, respectivamente, que pode ser realizada através de sedimentação, centrifugação ou filtração (RICHMOND, 2004). Ainda, podem ser feitas a floculação e flotação da biomassa, previamente (KIM *et al.*, 2005).

Após o término da fase de cultivo, se faz necessária a colheita da biomassa. A colheita é o processo que visa à remoção da água de cultivo para a obtenção da biomassa em concentração alta o suficiente e para que, assim, possa ser processada. Desta biomassa pode-se extrair os lipídeos e diversos outros produtos de valor agregado. O processo de colheita pode ser efetuado de diversas formas, dentre elas pode-se citar:

- Floculação química: As células das microalgas apresentam naturalmente carga elétrica negativa, oriunda de terminais orgânicos desprotonados, tais como carboxilatos, fosfatos, etc. Esta carga eletrostática auxilia na manutenção das células das microalgas em suspensão no meio de cultivo. O processo de floculação visa, basicamente, neutralizar esta carga elétrica, com a adição de um flocculante, possibilitando que as células se arranjam em flocos e decantem. Este processo se dá com a doação de cátions metálicos por parte dos flocculantes. Em geral, a floculação é uma técnica que é aplicada como um primeiro estágio da colheita, precedendo, por exemplo, a filtração ou a centrifugação com obtenção de elevados valores de eficiência (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; PIRWITZ; RIIKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015).
- Filtração: O método de filtração consiste em submeter o meio de cultivo a passar por uma membrana de poros reduzidos que retêm as células microalgais e permitem apenas a passagem do meio líquido (BABEL; TAKIZAWA; OZAKI, 2002). Na filtração de pequenos volumes, utiliza-se um aparato de filtração como um frasco de Kitasato ou similar, porém num cultivo de grande escala, a separação de enormes volumes de microalgas para posterior processamento da biomassa somente é viável se a espécie apresentar células grandes ou filamentosas (LOURENÇO, 2006). Em geral, usa-se filtração a vácuo para se acelerar o

processo de colheita. Uma desvantagem é que nem sempre a filtração convencional consegue reter as células da microalga, devido ao seu tamanho reduzido, tendo-se que recorrer a processos como filtração por membrana e ultrafiltração (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; BRENNAN; OWENDE, 2010). Embora não seja uma etapa obrigatória, uma possível saída para este problema seria uma etapa prévia de floculação (WAN *et al.*, 2015).

- **Centrifugação:** Método físico que vêm se provando muito eficiente na colheita de microalgas no decorrer do tempo (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017). Sua principal desvantagem envolve elevados custos, especialmente para cultivos de grandes volumes, devido ao gasto energético (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; BRENNAN; OWENDE, 2010). Uma possível saída para este problema seria uma etapa prévia de floculação antes do processo de centrifugação (PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015; WAN *et al.*, 2015).
- **Sedimentação:** É um processo lento que envolve a separação das células de microalgas do meio de cultivo pela ação da força gravitacional, portanto, um processo simples, porém com baixa eficiência (LOURENÇO, 2006; DE GODOS *et al.*, 2011). Em contra partida, a centrifugação que utiliza um equipamento de sedimentação de células que atua pela ação da força centrífuga, trata-se de um processo rápido de recuperação de biomassa, porém que requer alto consumo de energia. Por esta técnica a biomassa é concentrada sem a adição de produtos químicos, conservando suas características originais (LOURENÇO, 2006; VERMA *et al.*, 2010; DE GODOS *et al.*, 2011).

### **2.3.6 Síntese de lipídeos em microalgas**

As microalgas sintetizam os lipídeos a partir da fonte de carbono, seja inorgânico (CO<sub>2</sub>) ou orgânico (glicose, acetato, etc.). Os componentes e os teores de lipídeos nas células das microalgas variam de espécie para espécie, sendo divididos basicamente em lipídeos neutros (triglicerídeos e colesterol) e lipídeos polares como os fosfolipídeos. Os lipídeos neutros como os triglicerídeos são considerados como o principal material para a produção do biodiesel (HUANG *et al.*, 2010).

Um dos obstáculos para a produção de lipídios é o custo relativamente elevado, que se espera superar ao desenvolver novas e avançadas tecnologias. A produção de biomassa algal é mais cara do que a produção de culturas, pois o crescimento fotossintético requer luz, CO<sub>2</sub>, água e sais inorgânicos. A temperatura, também, deve estar controlada entre os 20 e 30 °C, para minimizar os gastos. A produção de biodiesel deve utilizar luz solar disponível livremente, apesar da variação sazonal e diária (CHISTI, 2007).

O teor de óleo comumente encontrado nas microalgas situa-se na faixa de 20 a 50%, porém espécies de microalgas como a *Botryococcus braunii* podem produzir teores de lipídeos em torno de 75%, assim como a espécie *Schizochytrium sp.* pode atingir teores de lipídeos próximos a 77%, conforme apresentado na Tabela 5, porém com baixa produtividade de biomassa. Entretanto espécies como a *Chlorella vulgaris*, requerem menor tempo de cultivo e apresentam alta produtividade celular, porém atingem quantidades de lipídeos inferiores a 20% (CHISTI, 2007; BRENNAN; OWENDE, 2010). Na Tabela 5, está disposto um levantamento comparativo entre as espécies de microalgas e sua capacidade de produzir lipídeos.

Tabela 5 - Espécies produtoras de lipídeos e suas respectivas porcentagens em relação à biomassa seca.

<b>Espécies</b>	<b>Conteúdo de Óleo (% em massa seca)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella</i>	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochysis sp.</i>	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20 – 35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia sp.</i>	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

Fonte: (CHISTI, 2007).

Além do teor lipídico, deve-se atentar ao perfil dos ácidos graxos presentes no material lipídico, uma vez que, características estruturais das moléculas de ácidos graxos como o

comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações refletem propriedades finais ao biodiesel, determinando assim a sua qualidade (KNOTHE; MATHEAUS; RYA, 2003).

De um modo geral, biodiesel oriundo de lipídeos que possuem em sua composição elevadas quantidades de ácidos graxos de cadeia insaturada, com destaque para os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) provocam problemas na ignição do combustível, auto-oxidação e entupimentos de filtros no motor que implicam em falhas no funcionamento do motor. Entretanto composições lipídicas ricas em ácidos graxos saturados, em especial os ácidos palmíticos (C16:0) e esteárico (C18:0) conferem ao biodiesel uma boa qualidade como uma ignição adequada e estabilidade de operação. (KNOTHE, 2005; RAMOS *et al.*, 2003).

### **2.3.7 Extração de lipídeos**

Após o término do cultivo e posterior colheita da biomassa, a próxima etapa é, normalmente, a extração dos lipídeos. Várias formas de se obter o óleo são conhecidas e estes processos, de um modo geral, podem ser divididos em extrações físicas (ultrassom, micro-ondas, etc.) ou químicas (extração por solvente). Embora, para se obter maiores rendimentos de extração, é comum o uso combinado destes processos. Desta forma, os processos físicos atuam rompendo as células das microalgas, aumentando o contato dos lipídeos com o solvente e, com isto, facilitando a extração e melhorando seu rendimento (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

A técnica criada por Bligh e Dyer (1959), consiste em misturar 100 mL de metanol e 100 mL clorofórmio a uma amostra de 100 g, agitando durante 3 minutos. O sistema formado então é monofásico e tem como objetivo inicial extrair totalmente para o meio os lipídeos presentes na amostra. Adiciona-se então, mais 100 mL de clorofórmio à mistura para aumentar ainda mais a solubilidade de lipídeos. Então, água é adicionada ao sistema, formando um ternário bifásico, onde há a fase orgânica, formada pelo clorofórmio e pelos lipídeos, e a fase aquosa, constituída por água e metanol. As duas fases são então separadas em um funil de decantação e a fase orgânica é evaporada. Por análise gravimétrica, é possível avaliar a quantidade de lipídeos presente na amostra (SMEDES; THOMASEN, 1996). O objetivo da adição de metanol e clorofórmio à amostra é dissolver tanto gorduras polares (fosfolipídeos e ácidos graxos livres), quanto apolares (triglicerídios). Após a adição da água,



somente a fase com clorofórmio mantém a solubilidade dos lipídeos (SMEDES; THOMASEN, 1996).

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

A extração por solventes pode, para aumento de eficiência, ser realizada com o auxílio de processos físicos de extração, como é o caso das micro-ondas e do ultrassom (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015). No caso das micro-ondas, mistura-se o solvente à biomassa e incidem-se as micro-ondas. As micro-ondas, ondas eletromagnéticas com frequência entre 0,3 e 300 GHz, atuam sobre a água da biomassa (além de outras moléculas polares) gerando aquecimento concentrado e abrupto sem contato direto com o material. Este aquecimento sobre a biomassa provoca aumento de pressão interna às células levando à sua ruptura, facilitando a extração dos lipídeos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015). O método usando ultrassom, por outro lado, aplica ondas sonoras sobre a mistura solvente/biomassa, que gera ciclos de alta e baixa pressão ao longo de seu percurso. Os ciclos de baixa pressão geram bolhas por evaporação que são comprimidas e implodem no ciclo de alta pressão, num fenômeno denominado cavitação. A cavitação provoca o rompimento das células, facilitando desta forma, o processo de extração (AL HATTAB; GHALY; PÉREZ DE LOS RÍOS, 2015; KANNAN; PATTARKINE, 2014). Em ambos os casos, o rompimento celular libera os lipídeos que se encontravam no interior das células ampliando seu contato com o solvente orgânico e, por isto, melhorando o rendimento do processo de extração (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

#### 2.4 USO DE EFLUENTES NO CULTIVO DA BIOMASSA MICROALGAL

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 (QUINTELAS *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2011).

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

Dentre os micro-organismos utilizados na bioissorção, as microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas envolvendo tratamento de efluentes, em função da sua capacidade de retenção e imobilização de metais (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012; TANGO, 2015). Além de produzirem diversos subprodutos de interesse, as microalgas se mostraram potencialmente úteis no tratamento de águas residuárias, já que possuem a habilidade de remover matéria orgânica e nutriente dos efluentes, incorporando-os à biomassa (BONINI, 2012).

Para que os biocombustíveis, produzidos a partir da biomassa de microalgas, sejam economicamente viáveis, têm sido propostos por diferentes autores que o cultivo seja realizado de forma alternativa, sem a utilização dos meios sintéticos convencionais (JOSEPH, V.; JOSEPH, A., 2001; BHATNAGAR *et al.*, 2011; CHINNASAMY *et al.*, 2010). O uso de águas de efluentes industriais, agrícolas e águas de esgotos domésticos têm sido indicados como meios alternativos, capazes de diminuir o valor agregado dos cultivos, visto que tais resíduos, geralmente, são liberados no meio ambiente sem tratamento prévio (PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

Espécies de algas como a *Chlorella* foram amplamente aplicadas para tratamento de águas residuais e demonstraram capacidade para remover nitrogênio, fósforo e demanda química de oxigênio (DQO) com diferentes tempos de retenção. Qualquer que seja o tipo de água residual, deve apresentar nutrientes que favoreçam o crescimento da biomassa para que possam ser usadas para compor meio de cultivo de microalga. O nutriente mais comumente encontrado nas águas residuais é o nitrogênio sob as formas de amônio e nitratos. O fósforo, outro nutriente importante no metabolismo microalgal, também, pode ser encontrado nas formas de íons inorgânicos  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  (WANG *et al.*, 2010; GULDHE *et al.*, 2017).

Segundo Bhatnagar *et al.* (2011), em efluentes de esgotos domésticos, *Chlorella minutissima* mostrou ser tolerante à ausência de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) dissolvido, crescendo em faixas variadas de pH (4-12) e diferentes intensidades luminosas ( $2\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  a  $30\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). No entanto, nem todas as microalgas avaliadas conseguiram crescer em águas residuárias

municipais. Deve-se considerar que, na entrada de um sistema de tratamento, a água geralmente apresenta excessos de nutrientes tais como sais dissolvidos e substâncias tóxicas, baixas concentrações de oxigênio, e ocorre pouca penetração de luz. A vantagem deste tipo de *habitat* é oferecer baixa competição, facilitando uma melhor adaptação das microalgas às condições existentes e, conseqüentemente, favorecendo o aumento da taxa de crescimento, ou seja, da produção de biomassa nas espécies estudadas.

Assim como as águas residuais, o lixiviado de aterro sanitário (chorume), também, contém nutrientes, além de matéria orgânica, metais e sais dissolvido e pode ser utilizado como meio de cultivo. No entanto, devido a alta concentração dos compostos presentes em sua composição, nos quais alguns são tóxicos, a diluição antes de ser acionado ao meio celular, torna-se necessária (CHEAH *et al.*, 2016). O lixiviado é um líquido produzido pela lixiviação de substâncias presentes em resíduos sólidos urbanos de aterros sanitários ou provenientes de sua decomposição. É obtido após a percolação dos interstícios da massa deste resíduo por água de origem pluviométrica ou do próprio lixo. Possui odor desagradável, cor escura, com presença de sólidos em suspensão, metais pesados, compostos nitrogenados, compostos tóxico, entre outros (MAIA *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2011; SOUTO, 2009; BIDONE, 2007).

Segundo Ghosh, Thakur e Kaushik (2017), de uma forma geral, a maioria dos lixiviados tem a mesma composição básica e é caracterizada por quatro grupos de poluentes.

- a) Matéria orgânica dissolvida: expressa como demanda química de oxigênio (DQO) ou Carbono orgânico total (COT), incluindo CH<sub>4</sub> e ácidos graxos;
- b) Macro componente inorgânico: Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sup>+4</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
- c) Metais pesados: (Cd<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Cr<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, etc);
- d) Compostos inorgânicos xenobióticos: hidrocarbonetos aromáticos, fenóis e alifáticos clorados.

A utilização de águas residuais ou lixiviados demonstram ser uma boa alternativa econômica e ecologicamente viáveis para a produção de energia de forma renovável, através da produção de microalgas. Deste modo, pode-se gerar biocombustíveis como biodiesel e bioetanol, a partir da biomassa microalgal produzida nos meios de cultivo contendo nutrientes reaproveitados das águas residuais ou lixiviado, que seriam descartados ou tratados, pelas maneiras convencionais, além de reduzir consideravelmente os custos de produção e operação (RICHARDS; MULLINS, 2013).

## 2.5 REOLOGIA

A reologia é definida como a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais. (TANNER, 2000). Os fluidos reais apresentam uma 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).

Schramm (2006), atribui à reologia a capacidade de descrever a deformação de um corpo sob a influência de tensões.

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, a qual é sinônimo de atrito interno, ou seja, medida da resistência ao escoamento (SHARMA; MULVANEI; RIZVI, 1999). A equação que descreve o comportamento destes fluidos é dada por:

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad (1)$$

No qual,  $\tau$  corresponde à tensão de cisalhamento,  $\gamma$  à taxa de deformação e  $\mu$  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  $\gamma$  ou de  $\tau$ , dependendo somente da composição e da temperatura (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). De acordo com Castro, Covas e Diogo (2001) os fluidos newtonianos são aqueles que apresentam uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, independente da taxa de deformação e da tensão de cisalhamento inicial.

Os fluidos que não obedecem ao postulado de Newton são designados genericamente de não-newtonianos (HOLDSWORTH, 1971). Fluidos não-newtonianos são caracterizados como todo o fluido cuja relação entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação não for linear e/ou não passar pela origem. Para fluidos não-newtonianos o termo viscosidade é substituído por  $\eta_{ap}$  que é a viscosidade aparente, e é função do gradiente de velocidade (VIDAL; GASPARETTO; GRANDIN, 2000). A viscosidade é função da taxa de deformação ou da tensão de cisalhamento e por isto, para caracterizá-los, é utilizada a

viscosidade aparente ( $\eta_a$ ), a uma taxa de deformação específica, representada pela equação (2):

$$\eta_a = \tau / \dot{\gamma}_i, \quad (2)$$

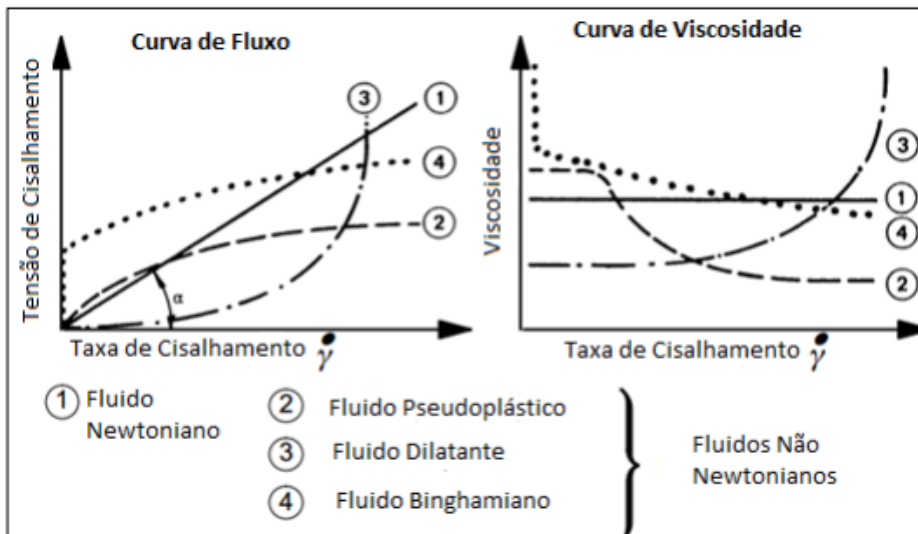
No qual,  $\dot{\gamma}_i$  é a taxa de deformação na qual se calculou  $\eta_a$ .

Segundo Rao e Rizvi (1986) os fluidos não-newtonianos podem ser dependentes ou independentes do tempo. Quando a temperatura e a composição são constantes, a viscosidade aparente depende apenas da taxa de deformação ou da tensão de cisalhamento. 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, no qual 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  $\tau_0$ . Para  $\tau > \tau_0$  a estrutura interna colapsa, permitindo o escoamento (BOURNE, 1982). 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 (OLIVEIRA, 2013 ; SCHRAMM, 2006). As curvas de fluxo, que caracterizam os fluidos estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Tipos de comportamento de fluxo.



Fonte: (SCHRAMM, 2006).

### 2.5.1 Modelos reológicos

Segundo Rao e Anantheswaram (1982), na literatura existem muitos modelos reológicos propostos. A escolha do tipo do modelo a ser utilizado deve ser feita em função das características do fluido que se quer estudar. Os modelos mais comumente utilizados são: Ostwald-de-Waele (Lei da Potência), Bingham, Herschel-Bulkley e Casson. Os modelos citados estão caracterizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação entre os modelos reológicos.

Modelo	Equação	Parâmetros
<b>Bingham</b>	$\tau = \tau_0 + \mu_p \cdot \gamma$	$\mu_p ; \tau_0$
<b>Lei da Potência</b>	$\tau = k \cdot \gamma^n$	$k_p; n$
<b>Casson</b>	$\tau^{0,5} = k_{0,c} + k_c \cdot \gamma^{0,5}$	$k_{0,c}; k_c$
<b>Herschel-Bulkley</b>	$\tau = \tau_0 + k_{HB} \cdot \gamma^n$	$k_{HB}; n$

Nota:  $\tau$ : tensão de cisalhamento;  $\gamma$ : taxa de deformação;  $k_p$ ,  $k_{HB}$ ,  $k_c$ : são os índices de consistência;  $k_{0,c}$ : constante do modelo;  $n$ : é o índice de comportamento.

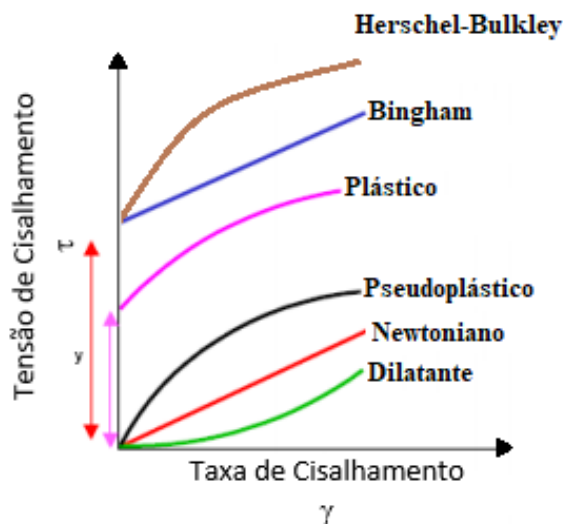
Fonte: O autor.

Segundo Machado (2002), o parâmetro reológico do modelo da lei da potência índice do comportamento do fluido ( $n$ ) é uma grandeza adimensional e indica fisicamente, o

afastamento do fluido considerado do modelo newtoniano; e o índice de consistência ( $k$ ) indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento, ou seja, quanto maior o valor de  $k$  mais consistente o fluido será.. Segundo Navarro (1997), através do modelo de Ostwald-de-Waele observa-se que a equação se reduz ao modelo de Newton quando o índice de comportamento do fluido  $n = 1$ . Como o índice de consistência ( $k$ ) não varia com a tensão de cisalhamento nem com a taxa de deformação, é o índice  $n$  que fará a distinção entre os comportamentos dos fluidos e, desta maneira, quanto mais distante o  $n$  do fluido estiver do valor unitário, mais distante também o fluido estará do comportamento newtoniano. Para  $n > 1$ , o fluido é dilatante; Para  $n = 1$ , o fluido é newtoniano; Para  $n < 1$ , o fluido é pseudoplástico.

Os modelos de Herschel-Bulkley e de Plástico de Bingham são usados para fluidos que só iniciam o processo de escoamento quando a tensão de cisalhamento aplicada supera uma tensão inicial que é própria do material (VIDAL; GASPARETTO; GRANDIN, 2000). A Figura 8 mostra as curvas de fluxo características para cada modelo matemático.

Figura 8 - Curvas de fluxo características para cada modelo matemático.



Fonte: O autor.

#### 2.5.1.1 Modelo de Bingham

Um plástico de Bingham não flui até uma tensão de cisalhamento,  $\tau$ , exercer um valor mínimo,  $\tau_0$ , conhecido também como “*Yield Point*”. Depois da tensão de cisalhamento mínimo ter sido aplicada, variações na tensão de cisalhamento são proporcionais as variação

na taxa de cisalhamento e a constante de proporcionalidade é chamada de viscosidade plástica ( $\mu_p$ ). Percebe-se que a unidade de viscosidade plástica é semelhante à unidade de viscosidade aparente ( $\mu_a$ ) para um fluido newtoniano (BOURGOYNE Jr *et al.*, 1991).

Considerando a teoria molecular coloidal, os parâmetros reológicos do fluido binghamiano possuem uma interpretação. O atrito entre as partículas dispersas e entre as próprias moléculas do líquido dispersante é o responsável por um dos componentes de resistência ao escoamento - a viscosidade plástica. Enquanto isso, as forças de interação entre as partículas dispersas são consideradas a causa da existência do outro parâmetro viscoso - o limite de escoamento, também denominada de componente eletroviscosa. É sabido ainda que se a concentração de partículas dispersas aumenta então a viscosidade plástica também aumenta, isto é, quando aumenta o potencial iônico do meio, causando um conseqüente aumento das forças eletrostáticas entre as partículas dispersas (MACHADO, 2002).

#### 2.5.1.2 Modelo de Ostwald Waale ou Lei da Potência

Como o modelo de Bingham, o modelo de potência requer dois parâmetros para caracterização do fluido. Entretanto o modelo de potência pode ser usado para representar fluidos pseudoplásticos ( $n < 1$ ), um fluido newtoniano ( $n = 1$ ) ou um fluido dilatante ( $n > 1$ ) (BOURGOYNE Jr *et al.*, 1991). Este modelo não se aplica para todo e qualquer fluido, nem a todo intervalo de taxa de cisalhamento. Entretanto, existe um número razoável de fluidos não-newtonianos que apresentam comportamento de potência, num largo intervalo de velocidades cisalhantes. Os parâmetros reológicos do fluido de potência são o índice de consistência ( $k$ ) que indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento, quanto maior o valor de  $k$  mais consistente é o fluido e mais difícil de escoar ele é. O índice de comportamento ou de fluxo ( $n$ ), que indica fisicamente o afastamento do fluido do modelo newtoniano. Se o valor de “ $n$ ” se aproxima de um então o fluido está próximo do comportamento newtoniano. Um grande número de fluidos não-newtonianos se comporta como pseudoplásticos, isto é,  $0 < n < 1$  (MACHADO, 2002). As emulsões e as soluções de polímeros ou de macromoléculas lineares são os exemplos mais típicos da indústria do petróleo. Tecnicamente, fluidos que “afinam” quando a vazão ou taxa de cisalhamento aumenta, são denominados pseudoplásticos. O “afinamento” de muitos materiais líquidos se manifesta reversivelmente, isto é, eles recuperam a sua viscosidade original alta, quando o cisalhamento é reduzido ou cessado. Teoricamente, as partículas retornam ao seu estado



natural de interação não orientada em relação às forças de cisalhamento. As gotas readquirem sua forma esférica e os agregados se reagrupam devido ao movimento browniano (MACHADO, 2002).

### 2.5.1.3 Modelo de Herschel-Bulkley

Este modelo é uma modificação do modelo de Ostwald de Waale onde se adicionou o parâmetro  $\tau_0$ , (tensão limite de escoamento ou limite de escoamento real). É chamado também de fluido de potência com limite de escoamento ou fluido de potência modificado e tem três parâmetros reológicos a serem levados em consideração, que define a equação do modelo. Materiais típicos que exibem tensão limite de escoamento são dispersões de argila com polímeros, empregados amplamente na indústria de petróleo como fluidos de perfuração. O modelo em questão é mais completo do que os anteriores, uma vez que a sua equação engloba três parâmetros, como visto, além do que, os modelos comentados anteriormente (Bingham e Ostwald de Waale) podem ser analisados, perfeitamente, como casos particulares deste (MACHADO, 2002).

### 2.5.2 Fatores que influenciam na reologia das suspensões

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 (MACHADO, 2002; HAMINIUK *et al.*, 2009).

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 provavelmente causará fragmentação dos agregados (MELO; MENEZZI, 2010).

Segundo Barnes, Hutton e Walters (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).

## 2.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento de experimentos é considerado, entre os métodos estatísticos o mais apropriado para investigação de variáveis influentes em processos. É um método estruturado e organizado, utilizado na determinação de diferentes fatores de entrada e saída do processo, envolvendo a definição do conjunto de experimentos, nos quais todos os fatores relevantes são variados sistematicamente (HARIDY; GOUDA; WU, 2011). O planejamento experimental é definido como um conjunto de técnicas estatísticas aplicadas ao planejamento, condução, análise e interpretação de testes controlados, buscando encontrar e definir fatores que influenciam os valores de um parâmetro ou um grupo de parâmetros de interesse (BRUNS; BARROS NETO; SCARMÍNIO, 2010). Este método representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis de entrada em determinadas variáveis de resposta indicando as melhores condições experimentais na tentativa de melhorar o processo com a maior precisão estatística ao menor custo possível. (BUTTON, 2005; ARANDA; JUNG; CATEN, 2008; SILVA, H. A; SILVA, M. B, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

A otimização de parâmetros de processo e a melhoria da qualidade de produtos têm sido amplamente utilizadas com o planejamento experimental através da aplicação de conceitos da engenharia e estatística (WANG; HUANG, 2007). Segundo Franceschini e Macchietto (2008), o planejamento experimental ou design of experiments (DOE) é uma ferramenta estatística que visa maximizar o valor das variáveis respostas obtidas em cada experimentação, além de reduzir o número de condições experimentais, a fim de minimizar custo e tempo.

### 2.6.1 Método de Taguchi

A metodologia desenvolvida pelo engenheiro e estatístico Genichi Taguchi, consiste em matrizes ortogonais, que levam seu nome e são uma excelente opção para a análise de dados em processos com múltiplas variáveis de entrada. Com esta metodologia, é possível se verificar, com um número reduzido de experimentos, quais variáveis de entrada possuem influência sobre as variáveis de saída de um processo. De certa forma, as matrizes ortogonais de Taguchi são baseadas nos planejamentos fatoriais completos, porém não é necessária a realização de todas as combinações experimentais possíveis. A notação para as matrizes ortogonais Taguchi é  $L_i$ , no qual  $i$  é o número de experimentos necessários para a realização da análise estatística (TAGUCHI, 1986; TAGUCHI; CHOWDHURY; YUIN, 2005).

O método de Taguchi é uma robusta ferramenta matemática, capaz de descobrir os parâmetros significativos de um processo ideal através de aspectos qualitativos múltiplos (CHIANG; HSIEH, 2009). De acordo com Barrado *et al.* (1996), a aplicação do Método de Taguchi consiste em:

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

O Método de Taguchi é capaz de oferecer vantagens como a redução da variabilidade do processo, conformidade próxima do resultado desejado e, conseqüentemente, a redução dos custos operacionais. Além disso, o método utiliza arranjos ortogonais que permitem estudar diversos fatores com um número reduzido de experimentos (RANA *et al.*, 2014).

Genichi Taguchi introduziu o importante conceito na literatura em experimentos chamado de fatores de ruído ou fatores incontroláveis, a percepção de Taguchi foi notar que esses fatores podem em muitos casos ser controláveis (variáveis). Experimentos são realizados modificando os fatores de controle, assim obtém o desenvolvimento de um modelo em que as respostas são uma função de ambos os fatores controláveis e os fatores de ruído. O termo robusto consiste em utilizar esse modelo para otimizar os fatores controláveis, de tal forma que a solução é insensível ou robusta as variações dos fatores de ruído. Os fatores controláveis são as variáveis do processo, enquanto que variáveis não controláveis são os ruídos, ou seja, fatores que interferem na variabilidade experimental (YANG; HWANG; LEE, 2002).

A quantidade de experimentos pode ser reduzida para um nível prático, por isso uma escolha é necessária para identificar os fatores mais representativos sobre a variável resposta. As matrizes ortogonais de Taguchi constituem um dos meios mais eficientes para identificar a importância dos fatores, realizando um número reduzido de experimentos (WANG; HUANG, 2015). O projeto experimental de Taguchi é um arranjo ortogonal para organizar os parâmetros que afetam o processo e determinar os fatores que afetam a qualidade do produto. O método experimental de Taguchi investiga como os parâmetros afetam o desempenho do processo em estudo (KISHORE *et al.*, 2009). Taguchi, de acordo com o trabalho de Rana *et al.* (2014), relata que o método é um tipo especial de matriz que se pode empregar em várias situações, no qual a quantidade de colunas das matrizes é número máximo de fatores que podem ser estudados. Uma matriz ortogonal é um projeto experimental construído para permitir uma avaliação matemática independente do efeito de cada um dos fatores, permitindo assim analisar os dados coletados de forma eficiente (TANSEL *et al.*, 2011).

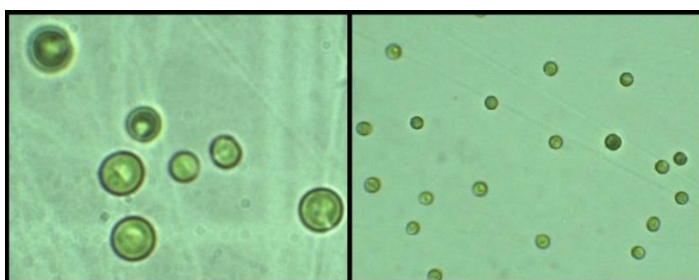
Uma vez realizados os experimentos, ao menos em duplicata, a análise dos dados se dá com o uso da análise de variância (ANOVA). Com o uso da ANOVA é possível se determinar quais, de todos os fatores estudados, são realmente influentes ao processo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS

Para o estudo em questão, utilizou-se a microalga marinha *Chlorella minutissima*, oriunda de Cananéia/SP (Figura 9), gentilmente doada pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

Figura 9 - Células de *Chlorella minutissima* utilizadas no presente trabalho.



Fonte: O autor.

A cepa da microalga *Chlorella minutissima* foi mantida em uma incubadora confeccionada em madeira e dotada de um fotoperíodo, controlada por um temporizador. A intensidade luminosa fornecida foi de 15 W por uma lâmpada fluorescente (Figura 10).

Figura 10 - Banco de células da microalga *Chlorella minutissima* no interior do cepário do Laboratório de Engenharia de Microalgas da Escola de Engenharia de Lorena



Fonte: O autor.

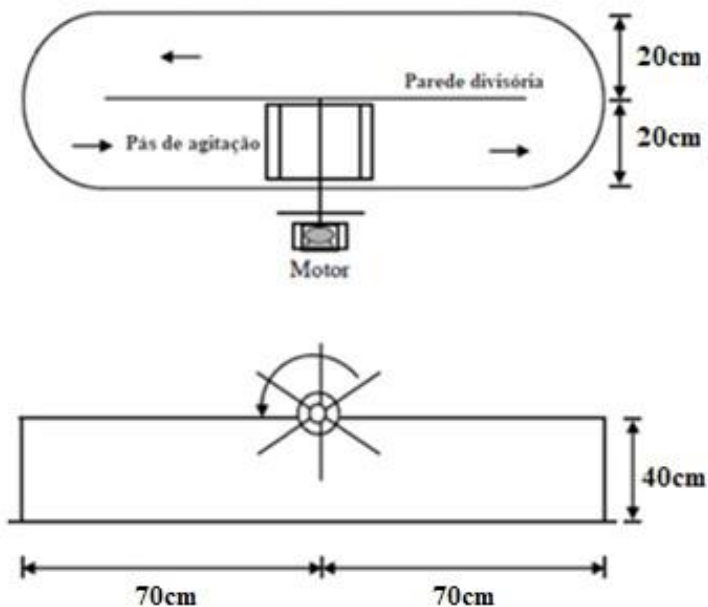
Para manutenção de um banco de células, foi feita a repicagem em erlenmeyers de 125 mL, com fotoperíodo de 12h:12h (luz/escuro) e luminosidade média de 4,8 klux. As repicagens foram feitas em períodos de 15 a 20 dias, na proporção de 10mL de cultura antecessora para 90mL de meio de cultivo novo e os frascos agitados de forma manual uma vez ao dia.

Para a manutenção do cultivo mãe, foi adotado o meio Guillard (1975), sendo que todos os reagentes utilizados no preparo foram de padrão analítico. As soluções de estoque, utilizadas para preparar o meio de cultivo, foram filtradas através de filtros de 0,22 $\mu$ m.

### 3.2 O REATOR TIPO *RACEWAY POND*

O reator usado para realizar os experimentos do presente trabalho foi um reator aberto do tipo *Raceway Pond* confeccionado em fibra de vidro com espessura de 3mm e com as dimensões: 140cm de comprimento x 40cm de largura x 40cm de altura, conforme a representação da Figura 11.

Figura 11 - Desenho representando as dimensões do reator tipo *Raceway*.



Fonte: O autor.

A *Raceway* conta com um sistema de agitação por meio de pás movidas por um motor de corrente contínua, um sistema de aeração confeccionado em tubos perfurados de PVC, que cobre o corredor contrário as pás e lâmpadas de led com comprimento de onda misturados entre azul e vermelho.

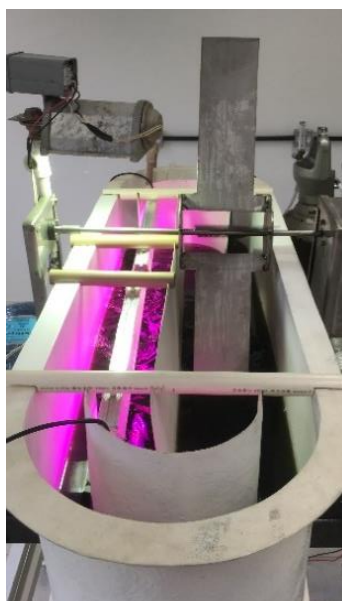
### 3.3 MEIO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O CRESCIMENTO DA MICROALGA *CHLORELLA MINUTISSIMA* EM REATOR DO TIPO *RACEWAY*.

O crescimento microalgal foi acompanhado em reator *Raceway*, onde os meios de cultivo utilizados foram soluções compostas por água salinizada e chorume (lixiviado de aterro sanitário), proveniente do aterro sanitário do município de Cachoeira Paulista.

Primeiramente, o chorume foi analisado com relação a sua composição metálica, através do método 3005a (USEPA, 1999). O resultado da análise encontra-se no APÊNDICE A. Uma vez analisado o chorume, os meios de cultivo microalgal foram preparados.

Os experimentos em reator *Raceway* foram realizados com agitação, através de pás movidas por um motor de corrente contínua e suprimento de ar, proporcionado por um compressor, ambos de maneira constante, em volumes fixos de 100 litros, à temperatura ambiente, com iluminação artificial permanente, através de lâmpadas de led em comprimentos de onda combinados entre o azul e o vermelho (Figura 12).

Figura 12 - Reator do tipo *Raceway Pond* utilizado nos cultivos.



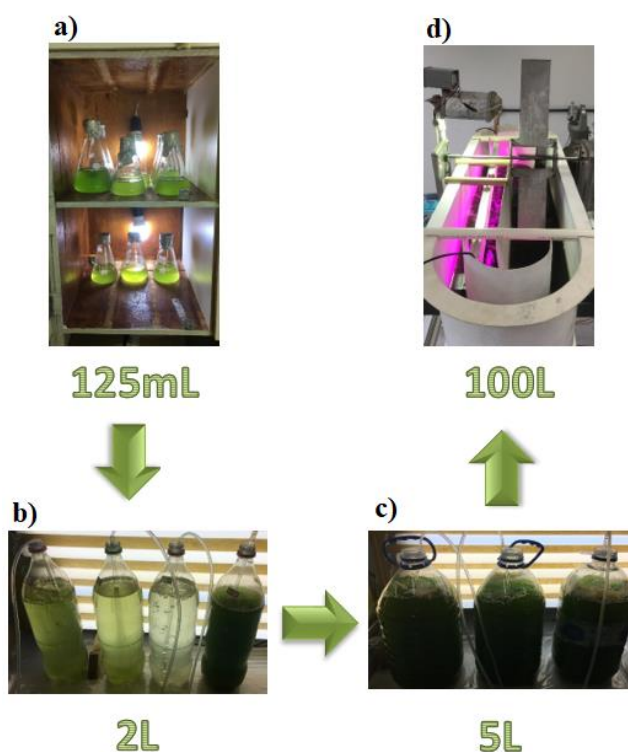
Fonte: O autor.

### 3.3.1 Preparo do inóculo

Para iniciar o experimento em reator *Raceway*, primeiramente fez-se necessário obter um grande volume de cultivo de microalga em concentração elevada. Para tal, fez-se a repicagem do cultivo do banco de células que estava mantido no cepário. Este procedimento foi realizado na proporção de 1 erlenmeyer de cultivo (125mL) para um recipiente plástico e transparente de 2L. Por sua vez, cada recipiente de 2L passou por uma nova repicagem em recipientes de 5L com as mesmas características.

Os recipientes utilizados para o repique foram previamente tratados com hipoclorito e neutralizadas com Tiosulfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) para evitar contaminação do inóculo. O acompanhamento do crescimento dos cultivos foi realizado por meio de leituras de absorvância em espectrofotômetro (UV-Vis, Bel Photonics) a 680nm até que o valor da leitura atingiu a marca de 1,500. O procedimento de preparo do inóculo com as etapas até o início do experimento na *Raceway*, está esquematicamente ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Etapas da preparação do inóculo até o início dos cultivos em reator *Raceway*: a) cultivos em erlenmeyer no cepário. b) cultivo em recipiente transparente de 2L; c) cultivo em recipiente transparente de 5L; d) cultivo em reator *Raceway*.





### 3.3.2 Desenvolvimento dos cultivos

Os cultivos foram realizados em batelada no reator do tipo *Raceway* e inoculados utilizando 15L de cultura microalgal com leituras de absorvância próximas a 1,500. Esse valor de absorvância foi adotado devido a necessidade de se padronizar a concentração celular ao se iniciar os experimentos e de modo a garantir uma boa concentração para desenvolvimento da cultura celular. Todos os cultivos foram realizados em duplicata e em batelada com volume total de 100L, que contavam com 15L da cultura microalgal com absorvância de 1,500 a 680nm, uma quantidade de chorume, que variou de acordo com a condição experimental e o restante de água. Ainda, foram adicionados cloreto de sódio (NaCl), visto que a *Chlorella minutissima* é uma espécie de microalga marinha, na proporção de 35g.L<sup>-1</sup> e em alguns casos o acetato de sódio, que representa a fonte de carbono fornecida ao cultivo, em diferentes concentrações, dependendo da condição experimental. A quantidade de acetato adicionado ao cultivo foi dividida propositalmente e adicionado em dois momentos - no início e após 7 dias - com os objetivos de não saturar as células de microalga e de proporcionar duas curvas de crescimento para o mesmo cultivo. Foram, também, ajustadas a vazão de aeração do reator e a frequência de agitação, a qual o cultivo foi submetido. Após ajustar os parâmetros mencionados, o cultivo inoculado foi mantido pelo período de 15 dias com agitação, aeração e iluminação constantes.

### 3.4 ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO

Assim como na preparação do inóculo, o crescimento microalgal foi acompanhado pela medida de absorvância em espectrofotômetro (UV-Vis, Bel Photonics), selecionando o comprimento de onda de 680nm para a realização das leituras. Segundo Zhao, Zhang e Cui (2015), esse valor de comprimento de onda quantifica a concentração da clorofila total, a qual é proporcional a biomassa produzida. As medidas de absorvância foram registradas diariamente, buscando-se manter intervalos de 24h entre cada medição, começando pelo início do cultivo. A partir dos valores medidos de absorvância, as concentrações do cultivo foram calculadas com o auxílio de uma curva de calibração. Curva esta obtida partindo de uma suspensão concentrada de *Chlorella minutissima*, que teve sua absorvância determinada com o auxílio do mesmo espectrofotômetro utilizado para o acompanhamento do crescimento dos cultivos, no comprimento de onda de 680nm. Partindo desta suspensão, diluições sucessivas foram feitas até que se atingisse a concentração mínima de 1:10 v/v.

Então, cada amostra teve sua absorvância determinada para o mesmo comprimento de onda no mesmo equipamento e com a relação entre a concentração da amostra diluída e o valor de absorvância medido, a curva de regreção foi traçada com um coeficiente de correlação no valor de 0,9257. Com os valores da absorvância e da concentração para cada dia do cultivo, os gráficos de absorvância vs tempo (em dias) e concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) vs tempo (em dias) foram traçados, para cada uma das diferentes condições experimentais com o objetivo de analisar como o crescimento da população de microalgas se comportou para cada condição experimental e comparar a efetividade entre elas.

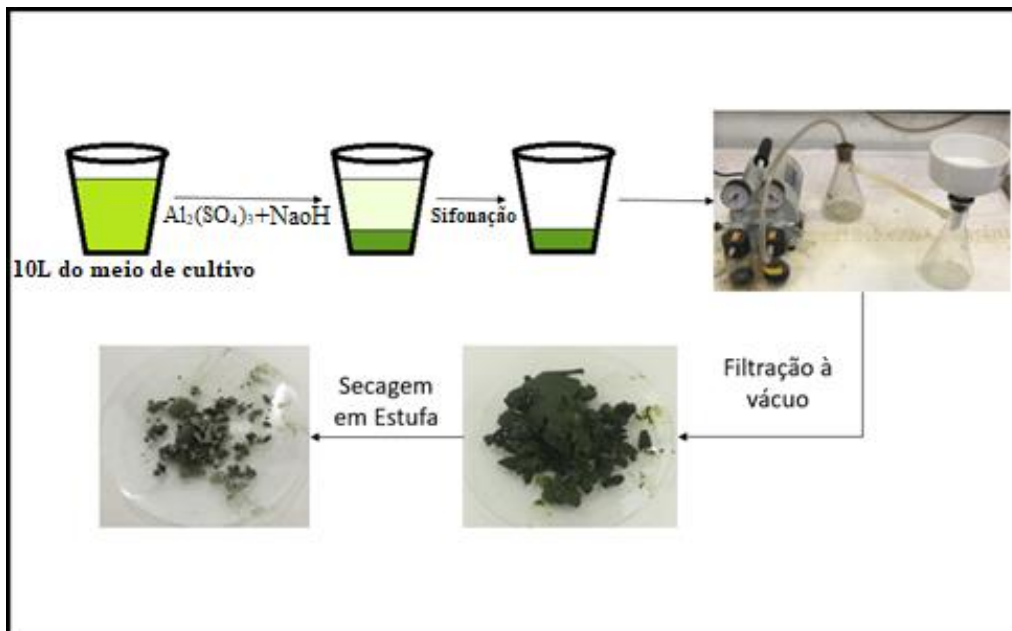
Outras duas maneiras de se analisar o crescimento, também, foram adotadas. Para contagem do número de células da suspensão microalgal, foi utilizada uma câmara de Neubauer aperfeiçoada em microscópio biológico trinocular com câmera digital (TIM108, Opton), no qual as regiões da câmara consideradas para contagem possuem  $1 \text{ mm}^2$  de área cada e como a profundidade é igual a 0,1 mm, o número de células contado na em cada região considerada corresponde ao número de células em  $0,1 \text{ mm}^3$ , sendo o valor adotado a média das quatro regiões e, também, foi utilizada uma lâmina micrométrica para mensurar o tamanho das células de microalgas presentes no cultivo. As fotografias do meio celular para o primeiro e último dia de cultivos estão dispostas nos APÊNDICES B-J. Já a determinação diária de biomassa seca foi realizada a partir de uma alíquota de 3mL de amostra coletada do cultivo, que foi transferida para um tubo de centrífuga previamente seco em liofilizador (LT1000, Terroni) a  $60^\circ\text{C}$  por aproximadamente 24h, pesado em balança analítica de precisão 0,0001g (S2202H, Bel) e submetida a centrifugação (centrífuga: 80-2B-15mL, Centrilab) a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo com o precipitado foi, novamente, colocado para secagem no liofilizador a  $60^\circ\text{C}$  por mais 24h. Passado o período, o tubo com o precipitado seco foi pesado na mesma balança analítica e a biomassa foi quantificada pela diferença entre as massas. Os resultados dessa análise está presente no APÊNDICE K.

### 3.5 OBTENÇÃO DA BIOMASSA

Como os cultivos foram feitos com 100L de volume, para o procedimento de quantificação de biomassa foi utilizada uma alíquota de 10L, a fim de tornar a análise viável, uma vez que para se executar as etapas descritas a seguir se gastaria muito em termos de tempo e recursos. Primeiramente, a biomassa do cultivo da microalga *Chlorella minutissima*

foi separada do meio de cultura por floculação, utilizando sulfato de alumínio 0,15M como agente floculante. Após a floculação, a biomassa foi submetida ao processo de filtração a vácuo com peneira molecular, utilizando um sistema dotado de funil de Buchner, Kitasato e uma bomba de vácuo (131 - Tipo 2 VC, Prismatec). Uma vez separada, a biomassa foi transferida para um vidro de relógio de massa conhecida e seguiu para a operação de secagem em liofilizador (LT1000, Terroni) a 60°C por um período aproximado de 24h. Depois de seca a biomassa, diposta no vidro de relógio, foi pesada em balança analítica (S2202H, Bel) com precisão de 0,0001g e quantificada pela diferença entre as massas. O fluxograma do procedimento é representado pela Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma do procedimento de obtenção da biomassa seca



Fonte: O autor.

Em seguida, ela foi macerada em almofariz de porcelana com o auxílio de um pistilo e armazenada em um recipiente de vidro previamente identificado para que fosse utilizada nas análises seguintes. A massa de biomassa obtida no processo foi considerada como o parâmetro “massa total obtida” e a partir dela foi feito o cálculo de produtividade de biomassa (PB), a fim de quantificar a produção diária do cultivo em litros. A equação (3) foi utilizada para o cálculo.

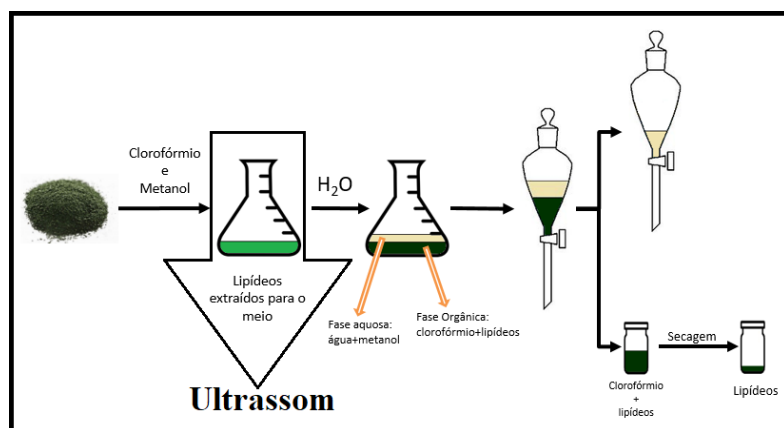
$$PB(mg.dia^{-1}.L^{-1}) = \frac{m_{biomassa\ total\ obtida} \cdot 100}{\Delta t_{dias}} \quad (3)$$

### 3.6 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

Para a extração de lipídeos, a biomassa foi previamente separada do meio de cultura pelo procedimento descrito no item 3.5. A partir dessa biomassa seca, a extração foi realizada baseando-se numa adaptação do processo proposto por BLIGH; DYER (1959), no qual 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 sua umidade foi ajustada acrescentando-se água destilada até que o valor atingido fosse de 64%, considerado como ideal de acordo com a pesquisa de Zorn *et al.* (2017). Em seguida, o Erlenmeyer foi transferido para um banho ultrassônico (Hielscher Ultrassound Technology, UP 200S) pelo período de 15 minutos. Logo após, acrescentou-se 9,4 mL de clorofórmio, 10,2 mL de metanol e agitou-se a solução até que fosse homogeneizada. A mistura foi retornada ao ultrassom de sonda por mais 35 minutos. Passado este período, foram adicionados mais 9,4mL de clorofórmio e submetida a mais 35 minutos do banho ultrassônico. Ao finalizar o processo ultrassônico, foi acrescentado 3,4 mL de água destilada na mistura a fim de separar as fases e facilitar a remoção dos lipídeos.

O conteúdo do erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro qualitativo com diâmetro médio de poros de 22µm e submetido a um período de 12h de repouso em funil de separação para garantir a completa separação de fases. Após esse período, a fase apolar foi recolhida em um frasco de vidro, previamente seco em liofilizador a 60°C por 24h para a completa evaporação do clorofórmio, e pesado em balança analítica (M214AIH, Bel) com precisão de 0,0001g. O fluxograma do procedimento está representado na Figura 15.

Figura 15 - Fluxograma da extração de lipídeos a partir da biomassa seca.



Fonte: O autor.

Após a secagem, o vidro foi novamente resfriado em dessecador e pesado, obtendo-se assim o teor de lipídeos a partir dos cálculos baseados na massa de biomassa utilizada. A equação (4) foi utilizada para a determinação do teor de lipídeos (L%) e, na sequência, utilizou-se a equação (5) para a determinação da produtividade média de lipídeos (PL):

$$L(\%) = \frac{m_{\text{óleo obtida}}}{m_{\text{biomassa utilizada}}} \times 100 \quad (4)$$

$$PL(\text{mg. dia}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{m_{\text{biomassa total obtida}} \cdot L(\%)}{\Delta t_{\text{dias}}} \quad (5)$$

Lembrando que a massa de biomassa total obtida foi extraída a partir de uma alíquota de 10L do cultivo total.

Outra maneira de se calcular a produtividade média de lipídeos é a partir da equação (6) para o resultado em  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  e da equação (7) para o resultado em  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , ambas em função da produtividade de biomassa (PB).

$$PL(\text{g. dia}^{-1} \text{L}^{-1}) = \frac{PB \cdot L(\%)}{100} \quad (6)$$

$$PL(\text{mg. dia}^{-1} \text{L}^{-1}) = 10 \cdot PB \cdot L(\%) \quad (7)$$

### 3.7 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

A determinação da DQO foi feita de acordo com a metodologia de Valente, Padilha e Silva (1997) para as amostras correspondentes ao primeiro e último dias de cultivo. O procedimento para a realização da DQO foi realizado em três fases, no qual a primeira delas foi a preparação das amostras, a segunda a digestão das amostras e a terceira a medição da absorbância.

#### 3.7.1 Preparo das amostras

Primeiramente, as amostras foram diluídas 20 vezes de modo a adequar a concentração de íons cloreto com o intuito de minimizar a interferência. 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 *Chlorella minutissima* é de origem marinha.

As amostras foram preparadas em tubos de ensaio de vidro, a partir da adição de 50mg Sulfato de Mercúrio ( $\text{HgSO}_4$ ), responsável pelo controle da interferência dos íons cloretos em solução; 2,5mL de Sulfato Ácido de Prata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ), responsável por tornar o meio ácido; 0,5mL de Dicromato de Potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) (forte agente oxidante); 0,3mL de água destilada e 2mL da amostra diluída.

### 3.7.2 Digestão e medição da absorbância

A digestão das amostras foi realizada em um bloco digestor de concreto à temperatura de 150°C pelo período de 1 hora e meia. Terminada a digestão, os tubos foram retirados do bloco digestor e armazenados em um armário com baixa luminosidade à temperatura ambiente por 24h para o resfriamento e sedimentação do precipitado, quando houve.

### 3.7.3 Medição da absorbância

Com os tubos já resfriados, as medidas de absorbância das amostras foram feitas no comprimento de onda de 420 nm em cubeta de quartzo de faces polidas e laterais escuras com caminho óptico de 10mm e volume máximo de 1,4mL. Os valores de absorbância medidos foram convertidos em valores de concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) através de uma curva de calibração presente no APÊNDICE L.

## 3.8 ANÁLISES REOLÓGICAS

Os ensaios reológicos foram feitos em duplicata para cada amostra diária de cada condição experimental à temperatura controlada de 25°C no reômetro Brookfield (modelo LVDV-3T), de maneira automatizada por meio do *software* Rheocalc T.

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 de 30s, no qual a velocidade de rotação era iniciada a 30rpm e era incrementada em 30 unidades para cada intervalo até que se atingisse a velocidade de 240rpm. Para cada ponto,

foram obtidos dados de tensão de cisalhamento, taxa de cisalhamento e viscosidade. Analisar esses parâmetros é de extrema importância para o estudo reológico de suspensões, além de determinar as características do fluido

As curvas reológicas obtidas foram ajustadas aos modelos reológicos de Casson, Lei da Potência, Bingham e Herschel-Bulkley, visando buscar o modelo que melhor se adequa as condições e propriedades físicas do fluido suspensão de microalgas. A análise estatística foi realizada utilizando as variáveis do modelo, que melhor se ajustou ao caso, buscando as condições para que o cultivo microalgal se aproximasse de um fluido newtoniano.

### 3.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos fatores: concentração de chorume e da fonte de carbono (acetato de sódio) adicionados ao inóculo, a vazão da aeração injetada no meio de cultivo e a frequência de rotação do agitador, a qual o cultivo foi submetido nas variáveis resposta em termos de: crescimento microalgal, biomassa, lipídeos, redução de DQO e parâmetros reológicos (obtidos após os ajustes dos reogramas aos modelos reológicos) ao final do cultivo.

Para a avaliação dos efeitos dos fatores anteriormente descritos, nas variáveis resposta, foi feito um planejamento experimental, utilizando o arranjo ortogonal L<sub>9</sub> de Taguchi, no qual é possível avaliar até 4 fatores em 3 níveis diferentes. A Tabela 7 apresenta os fatores com os respectivos ajustes de níveis.

Tabela 7 - Variáveis de entrada e níveis usados para determinação dos parâmetros significativos no cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.

Código	Fatores	Nível Baixo (1)	Nível Médio (2)	Nível Alto (3)
A	CC (%)	2,5	5,0	7,5
B	CFC (g.L <sup>-1</sup> )	0	1	2
C	VA (vvm)	0,05	0,10	0,15
D	FA (rpm)	4	6	8

Nota: CC - concentração do chorume; CFC - concentração da fonte de carbono; VA - vazão de aeração; FA - frequência de rotação do motor do agitador (frequência de agitação).

Fonte: O autor.

Na Tabela 8 está disposto o arranjo ortogonal da matriz L<sub>9</sub> de Taguchi, utilizada para o planejamento de experimentos.

Tabela 8 - Arranjo ortogonal da matriz Taguchi L9.

Condição Experimental	CC	CFC	VA	FA
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: O autor.

### 3.9.1 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados os *softwares* Statistica 13.5, Minitab 19 e o Excel 2016. Deste modo, verificou-se os efeitos dos fatores (CC - Concentração de choro; CFC - Concentração da Fonte de Carbono (acetato de sódio) e VA - Vazão de aeração) sobre as variáveis respostas (crescimento celular da suspensão de microalgas, biomassa total obtida, PB = Produtividade de Biomassa, teor de lipídeos, PL = Produtividade média de Lipídeos, redução de DQO, n = índice de comportamento e k = índice de consistência). Após obter e organizar as respostas para todos os parâmetros, os dados obtidos foram analisados utilizando os softwares. O Statistica 13.5 e o Minitab 19, foram responsáveis pelo cálculo dos efeitos, por gerar os gráficos, fazer propostas de melhor ajuste e disponibilizar outras informações, que auxiliaram na discussão dos resultados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada no Excel 2016 em uma planilha desenvolvida exclusivamente para atender as condições do presente trabalho. A partir da ANOVA, foi possível determinar quais fatores foram mais impactantes para cada variável resposta, significativos, relevantes ou não, utilizando o teste F, no qual o valor calculado de F para cada fator é comparado a um valor de F tabelado - chamado de  $F_{crítico}$ . Quando  $F_{fator} > F_{crítico}$ , o fator é significativo no processo e a variação de ajuste influencia fortemente no valor da resposta. Quando o fator não atinge um valor de F maior que  $F_{crítico}$ , adota-se um critério simplificado chamado critério de Padke, no qual quando  $F_{crítico} > F_{fator} > 2$  o fator é dito como relevante, impactando de forma razoável na resposta. Para valores em que o valor de F calculado para o fator é inferior a 2, diz-se que o fator é não significativo, deste modo, não promove influência na resposta, independentemente de como for ajustado.



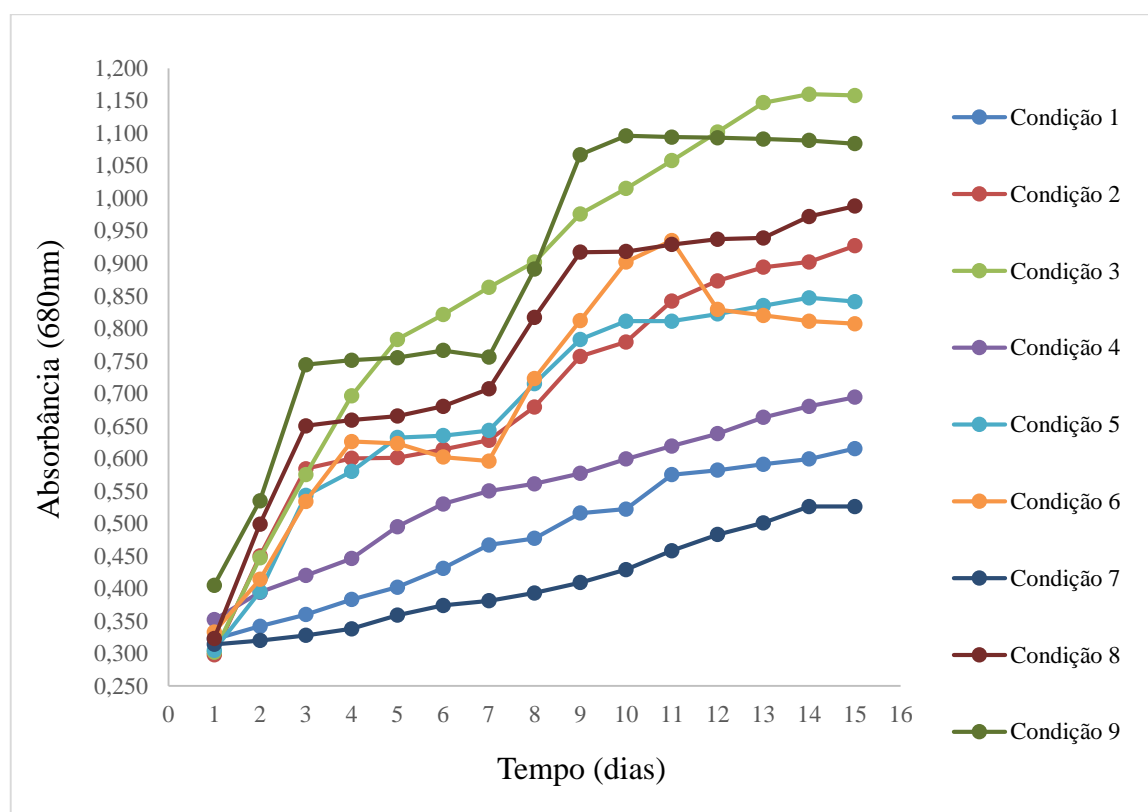
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir foram previamente comentados de uma maneira mais geral com algumas observações pertinentes. Uma discussão mais aprofundada sobre cada parâmetro analisado e a influência dos fatores no valor das respostas observada foi feita a partir da análise estatística da matriz ortogonal de Taguchi e será abordada no decorrer do capítulo.

### 4.1 CRESCIMENTO CELULAR DOS CULTIVOS

As curvas apresentadas no gráfico da Figura 16, mostram os valores de absorbância da suspensão de microalga *Chlorella minutissima*, para cada condição de experimental, em função do tempo em dias.

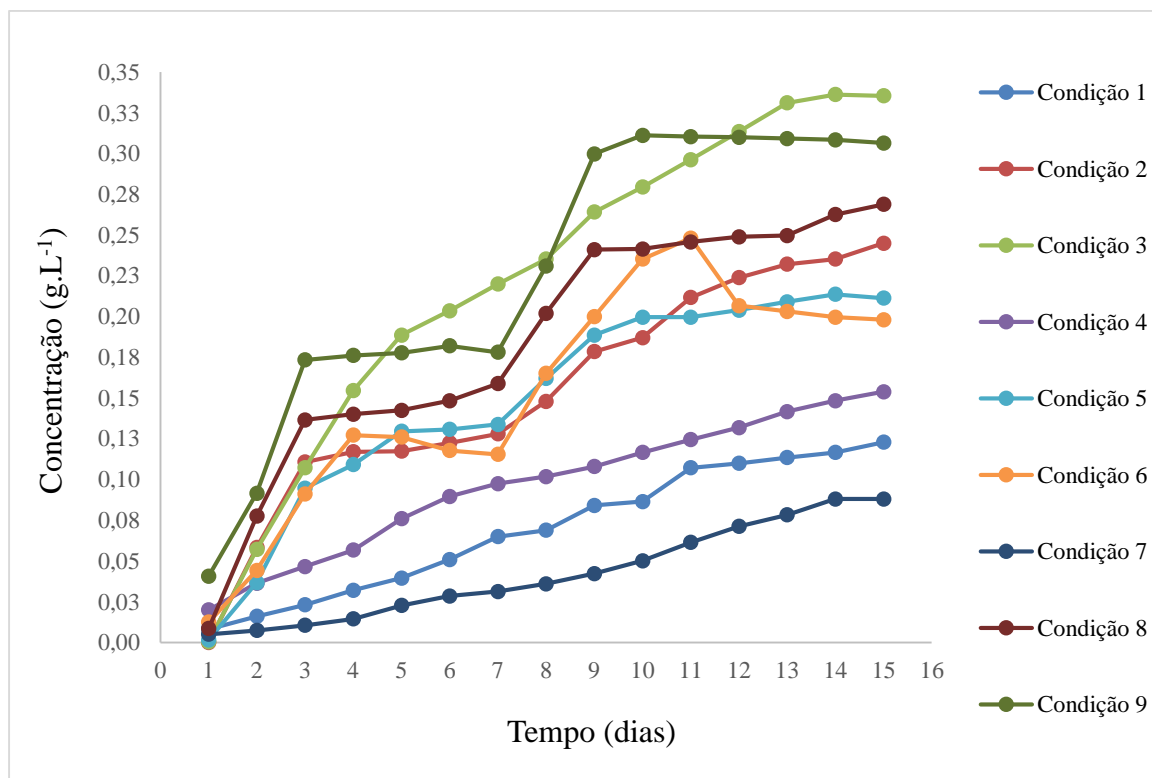
Figura 16 - Comparação do crescimento diário da suspensão da microalga *Chlorella minutissima* pelo parâmetro da absorbância ( $\lambda=680\text{nm}$ ).



Fonte: O autor.

Para melhor apresentação e discussão dos resultados, foi feita a conversão dos dados obtidos dos valores de absorbância da suspensão de microalgas para valores de concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ), através de uma curva de calibração presente no APÊNDICE M. O resultado desta conversão está presente na Figura 17.

Figura 17 - Comparação do crescimento diário da suspensão da microalga *Chlorella minutissima* pelo parâmetro da concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ).



Fonte: O autor.

A diferença no crescimento (concentração celular da suspensão microalgal) entre os cultivos pode ser facilmente percebida e está relacionada a variação das condições experimentais, no qual cada cultivo foi realizado. De acordo com os gráficos das Figuras 16 e 17, os melhores resultados obtidos, em termos de crescimento microalgal, foram para as condições de cultivo 3 e 9 com valores aproximados de concentração de  $0,33\text{g.L}^{-1}$  com a concentração da fonte de carbono (acetato) ajustada no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), porém com a condição 3 tendo adição de choro ajustada no nível 1 (2,5%), enquanto a condição 9 teve adição do lixiviado ajustada em nível 3 (7,5%). As condições de cultivo 4 e 7, junto da condição 1, foram as que apresentaram menor crescimento, sendo que a condição 4 teve a

adição de chorume ajustada no nível 2 (5,0%) e a condição 7 ajustada no nível 3 (7,5%) e ambas não possuem adição da fonte de carbono. Deste modo, observa-se que a adição de acetato é extremamente importante para o crescimento microalgal, principalmente na presença de altas concentrações do lixiviado. Da Figura 17 observa-se que, quando não houve suplementação da fonte de carbono (condições 2 e 4), o crescimento celular não foi eficiente. De acordo com, Ohse *et al.* (2009) e Zhao, Zhang e Cui (2015), é sabido que o CO<sub>2</sub> contribui para o crescimento celular de maneira geral, visto que o carbono participa do processo de fotossíntese dos cultivos fotoautotróficos na forma de CO<sub>2</sub> gasoso e na forma de substrato orgânico, como a glicose ou sal (bicarbonato, acetato) nos cultivos heterotróficos e mixotróficos, embora cada espécie de microalga requer uma suplementação de CO<sub>2</sub> específica no seu meio. Segundo os autores, para a *Chlorella sp.*, uma suplementação de 5% de dióxido de carbono é a adequada enquanto que a *Chlorella minutissima* (foco desse projeto) necessita de apenas 2% de suplementação desse gás para o crescimento ser aprimorado.

Segundo Chiu *et al.* (2015), a carga metálica e outros compostos orgânicos presentes na composição do chorume pode configurar a ele uma certa toxicidade e, assim, causar um aumento no tempo de adaptação da microalga ao meio de cultivo, prejudicando seu crescimento. Contudo, a presença de uma elevada carga orgânica e nutrientes, nele presentes, também, propiciam um melhor crescimento celular.

Ainda, em 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 estas 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.

De acordo com Tagliaferro (2017), o lixiviado proveniente de aterros sanitários pode ser utilizado como meio de cultivo, visto que o este 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).

## 4.2 BIOMASSA

### 4.2.1 Quantificação da biomassa obtida

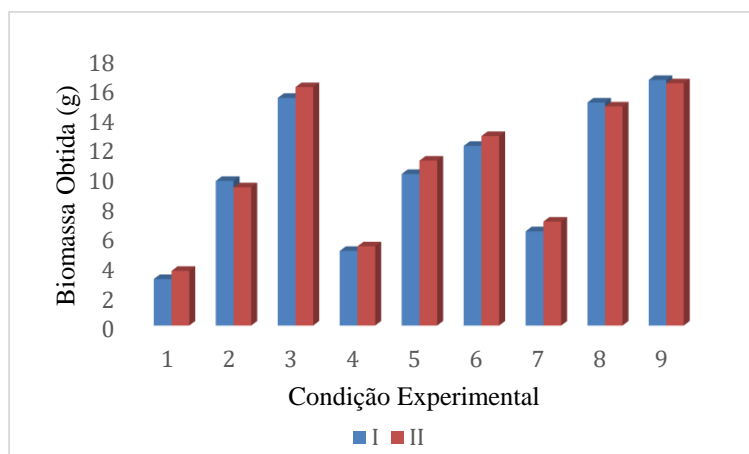
Os valores de biomassa, em gramas, obtidos para cada condição de cultivo, em duplicata, estão dispostos na Tabela 9, no qual a numeração romana “II” indica a réplica do cultivo em questão. Para melhor visualização da comparação entre os cultivos e suas réplicas, os dados da tabela foram dispostos graficamente na Figura 18.

Tabela 9 - Quantidade de biomassa obtida de 10 L de cultivo.

Condição Experimental	Biomassa Obtida (g)
1	3,12
1 II	3,67
2	9,71
2 II	9,28
3	15,30
3 II	16,02
4	5,01
4 II	5,32
5	10,18
5 II	11,08
6	12,07
6 II	12,73
7	6,33
7 II	6,98
8	14,99
8 II	14,72
9	16,51
9 II	16,28

Fonte: O autor.

Figura 18 - Comparação da obtenção de biomassa entre as diferentes condições de cultivo.



Fonte: O autor

As condições experimentais, que geraram a maior quantidade de biomassa, foram a 3, 8 e 9 com valores superiores a 14g, apresentando as médias de 15,66; 14,86 e 16,40g, respectivamente. As condições 3 e 9, possuem adição de acetato ajustadas no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), enquanto que a condição 8 possui a adição da fonte de carbono ajustada no nível 2 ( $1\text{g.L}^{-1}$ ). Porém, ambas as condições 8 e 9, possuem adição de chorume ajustada no nível 3 (7,5%), que é justamente o que difere as condições 3 e 9, no qual a 3 possui adição do lixiviado ajustada no nível 1 (2,5%). Deste modo, pode-se perceber que a quantidade de acetato adicionado é o que mais influencia na obtenção de biomassa total. O que faz sentido, já que a quantidade de biomassa está diretamente relacionada a concentração do cultivo e, como já mencionado, o acetato é o maior responsável pelos maiores valores de concentração obtidos. O chorume, também, é um fator muito importante, como já pôde ser visto, mas mesmo a condição 3 tendo adição de chorume ajustada no nível 1 (2,5%), pelo fato de conter adição de acetato ajustada no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), conseguiu superar a condição 8, que conta com a adição de chorume ajustada no nível 3 (7,5%) e adição de acetato ajustada no nível 2 ( $1\text{g.L}^{-1}$ ). Assim, apesar da adição de chorume ser um fator importante, não é tanto quanto a fonte de carbono. Os outros fatores - frequência de agitação e vazão de aeração - também, tem a sua importância, mas não são tão significantes. Mesmo a condição 4 possuindo vazão de aeração ajustada no nível 2 (0,10vvm) e frequência de agitação ajustada no nível 3 (8rpm) e a condição 6 possuir a frequência de agitação ajustado no nível 2 (6rpm) e vazão de aeração ajustada no nível 1 (0,05vvm), o cultivo 4 apresenta um dos valores mais baixos de obtenção de biomassa total, sendo de uma média de 5,16g, enquanto o cultivo 6 apresenta um valor médio bom de 12,40g. Isto se deve ao fato de que condição 6 apresenta o fato adição de acetato ajustado no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), enquanto que a condição 4 não apresenta adição da fonte de carbono.

#### **4.2.2 Produtividade de biomassa**

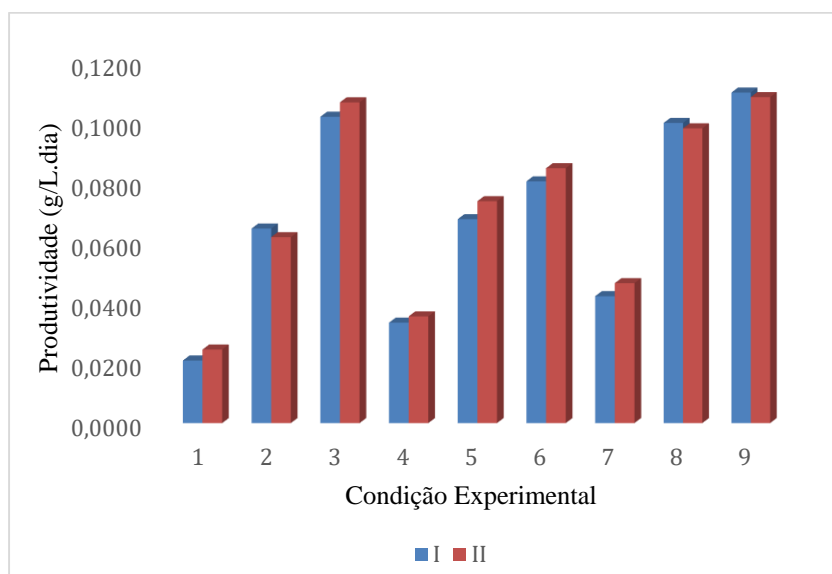
Os dados de produtividade de biomassa para cada condição experimental são importantes, uma vez que deste modo pode-se enxergar com mais clareza o quanto de biomassa está sendo produzida ao decorrer dos dias de cultivo. Esses dados estão na Tabela 10, no qual o parâmetro produtividade foi medido em gramas de biomassa obtido por litros e dias de cultivo. Também, o gráfico de comparação entre as condições experimentais e suas réplicas, está ilustrado na Figura 19.

Tabela 10 - Produtividade de biomassa.

Condição Experimental	Produtividade de Biomassa (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )
1	0,0208
1 II	0,0245
2	0,0647
2 II	0,0619
3	0,1020
3 II	0,1068
4	0,0334
4 II	0,0355
5	0,0679
5 II	0,0739
6	0,0805
6 II	0,0849
7	0,0422
7 II	0,0465
8	0,0999
8 II	0,0981
9	0,1101
9 II	0,1085

Fonte: O autor.

Figura 19 - Comparação da produtividade de biomassa entre as diferentes condições de cultivo.



Fonte: O autor.

Analogamente ao que foi discutido no item anterior, as condições experimentais 3, 8 e 9, foram as que apresentaram maiores valores de produtividade de biomassa com valores

médios de 1,044; 0,099 e 1,093g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Da mesma forma, observou-se, que os fatores mais importantes foram a concentração da fonte de carbono e a concentração de chorume, nessa ordem.

### 4.3 LIPÍDEOS

#### 4.3.1 Teor de lipídeos

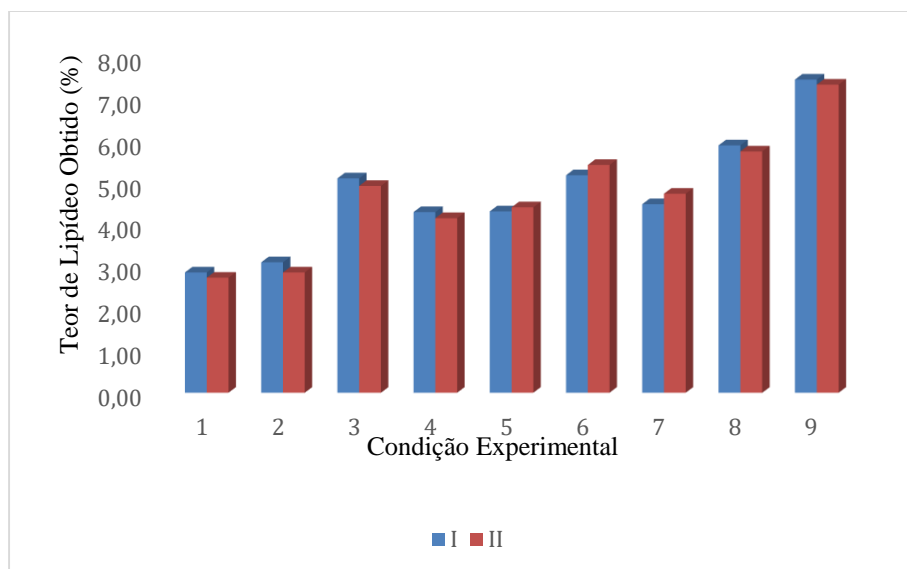
Além da quantidade de biomassa que cada condição experimental produz, também, faz-se necessário analisar o quanto de lipídeo pode ser extraído dessa biomassa e isto está diretamente relacionado as características da biomassa obtida e varia pra cada condição. A extração de lipídeos foi feita a partir de aproximadamente 1g da biomassa retirada do cultivo para cada condição experimental e o teor de lipídeos foi calculado pela comparação entre a massa de lipídeo obtida e a de biomassa utilizada. Todos os valores mencionados estão apresentados na Tabela 11 e o gráfico da Figura 20, ajuda em uma melhor análise dos dados.

Tabela 11 - Teor de lipídeos

<b>Condição Experimental</b>	<b>Massa de Biomassa Utilizada (g)</b>	<b>Massa de Lipídeo Extraído (g)</b>	<b>Teor de Lipídeos (%)</b>
<b>1</b>	1,0390	0,0299	2,88
<b>1 II</b>	1,0210	0,0281	2,75
<b>2</b>	1,0159	0,0317	3,12
<b>2 II</b>	1,0080	0,0290	2,88
<b>3</b>	1,0110	0,0518	5,12
<b>3 II</b>	1,0053	0,0497	4,94
<b>4</b>	1,0300	0,0445	4,32
<b>4 II</b>	1,0704	0,0447	4,18
<b>5</b>	1,0236	0,0444	4,34
<b>5 II</b>	1,1340	0,0503	4,44
<b>6</b>	1,0042	0,0522	5,20
<b>6 II</b>	1,0030	0,0546	5,44
<b>7</b>	1,0490	0,0473	4,51
<b>7 II</b>	1,0004	0,0476	4,76
<b>8</b>	1,0320	0,0610	5,91
<b>8 II</b>	1,0110	0,0583	5,77
<b>9</b>	1,0030	0,0750	7,48
<b>9 II</b>	1,0942	0,0805	7,36

Fonte: O autor.

Figura 20 - Comparação do teor de lipídeos obtido entre as diferentes condições de cultivo.



Fonte: O autor.

A partir dos resultados, percebe-se que a condição experimental 9 foi a que apresentou maior teor de lipídeos, com os ajustes no nível 3 para adição de choro (7,5%) e fonte de carbono ( $2\text{g.L}^{-1}$ ). As condições 8 e 6, também, apresentaram bons resultados, sendo a adição de choro ajustada no nível 3 (7,5%) para a condição 8 e no nível 2 (5,0%) para a condição 6 e a fonte de carbono ajustada no nível 2 ( $1\text{g.L}^{-1}$ ) para a condição 8 e no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) para a condição 6, o que demonstra que a quantidade de choro adicionada impacta mais no teor de lipídeos obtido do que a quantidade de acetato.

#### 4.3.2 Produtividade média de lipídeos

Analogamente aos cálculos de produtividade para a biomassa, os dados de produtividade média de lipídeos vizam apresentar os resultados de modo que se possa englobar todo o cultivo, uma vez que, ao invés de se analisar o teor de lipídeos obtido a partir de 1g de biomassa, foi calculada o quanto se produziu de lipídeo por litro de cultivo durante os 15 dias. Deste modo, os resultados em termos de produtividade de lipídeos estão atrelados aos valores obtidos de biomassa total, de onde os lipídeos foram extraídos. Os valores de produtividade estão na Tabela 12 e o gráfico da Figura 21 mostra um comparativo entre os cultivos feitos nas diferentes condições experimentais e entre suas réplicas.

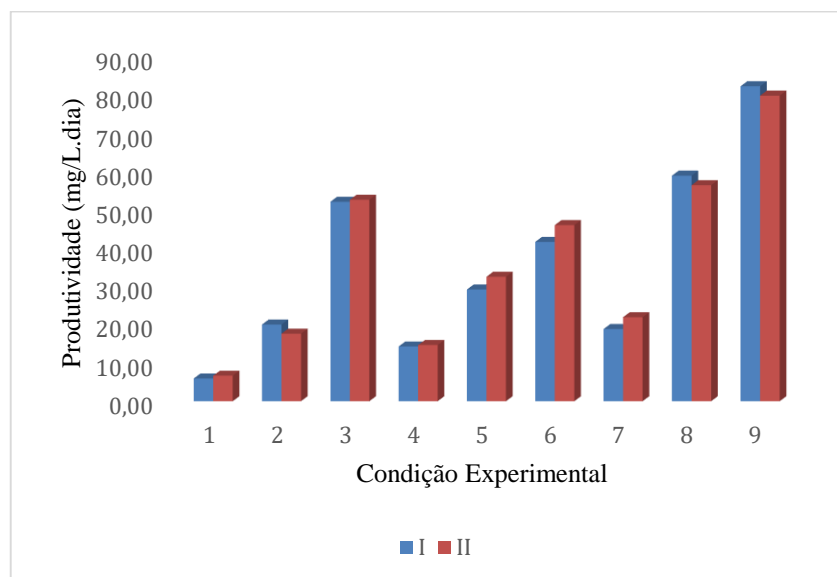


Tabela 12 - Produtividade média de lipídeos.

Condição Experimental	Biomassa Total Obtida no Cultivo (g)	Produtividade Média de Lipídeos (mg.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )
1	3,12	5,99
1 II	3,67	6,73
2	9,71	20,20
2 II	9,28	17,80
3	15,30	52,26
3 II	16,02	52,80
4	5,01	14,43
4 II	5,32	14,81
5	10,18	29,44
5 II	11,08	32,76
6	12,07	41,83
6 II	12,73	46,20
7	6,33	19,03
7 II	6,98	22,14
8	14,99	59,07
8 II	14,72	56,59
9	16,51	82,33
9 II	16,28	79,88

Fonte: O autor.

Figura 21 - Comparação da produtividade média de lipídeos entre as diferentes condições de cultivo.



Fonte: O autor.

Da mesma forma que na análise de teor de lipídeos, a condição de cultivo com maior produtividade média de lipídeos foi a condição 9. Isso se deve ao fato de que além desta condição apresentar uma ótima produção em teor de lipídeos, também, proporciona a maior obtenção de biomassa total dentre todas as condições experimentais. Porém, apesar da condição 6 demonstrar um valor maior de teor de lipídeos do que a condição 3, a última

proporciona maior obtenção de biomassa total que a primeira, sendo suficiente para apresentar um valor de produtividade média em lipídeos superior.

#### 4.4 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

Na Tabela 13, estão os resultados da análise de DQO, realizada em duplicata. O valor de redução percentual foi obtido comparando a concentração atingida no último dia do cultivo com relação a concentração do primeiro dia. Os valores de concentração foram obtidos pela conversão dos valores de absorbância lidos no espectrofotômetro, através de uma curva de calibração presente no APÊNDICE L.

Tabela 13 - Análise de redução da Demanda Química de Oxigênio.

Condição Experimental	Concentração DQO (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )		Redução DQO (%)
	Primeiro dia	Último dia	
1	7,367	6,866	6,80
1 II	7,316	6,836	6,56
2	7,351	6,051	17,68
2 II	7,372	6,102	17,22
3	7,323	5,911	19,28
3 II	7,320	5,930	19,00
4	7,651	6,419	16,11
4 II	7,721	6,405	17,05
5	7,712	6,964	9,70
5 II	7,674	6,990	8,92
6	7,681	6,032	21,47
6 II	7,693	6,062	21,20
7	8,115	7,849	3,27
7 II	8,105	7,795	3,82
8	8,091	5,783	28,53
8 II	8,101	5,757	28,93
9	8,061	7,078	12,19
9 II	8,108	7,064	12,87

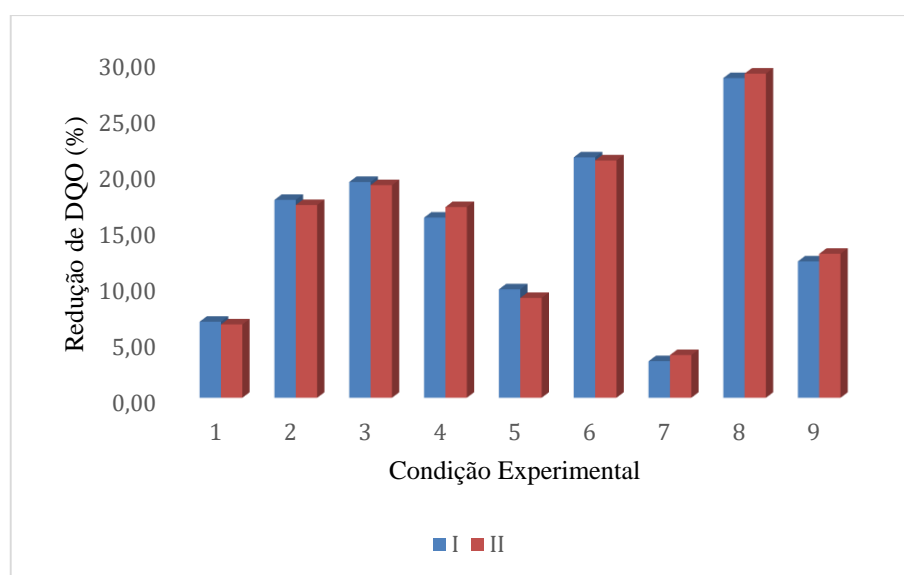
Fonte: O autor.

Analisando os dados da Tabela 13, observa-se que a condição 8 foi a que atingiu a maior redução de DQO, com o valor médio de 28,73%. As condições 3 e 6, também,

apresentaram bons valores de redução, na faixa de 20%. Já as condições 1, 5 e 7 tiveram redução inferior a 10%. Deste modo, percebe-se que os fatores CFC e FA ajustados nos níveis 2 e 3, foram os que propiciaram os mais altos percentuais de redução de DQO, enquanto que a concentração de chorume foi determinante para os valores de concentração inicial desse parâmetro.

O gráfico da Figura 22 mostra um comparativo entre a resposta dos cultivos feitos nas diferentes condições experimentais e entre suas duplicatas.

Figura 22 - Comparação da redução de DQO entre as diferentes condições de cultivo.



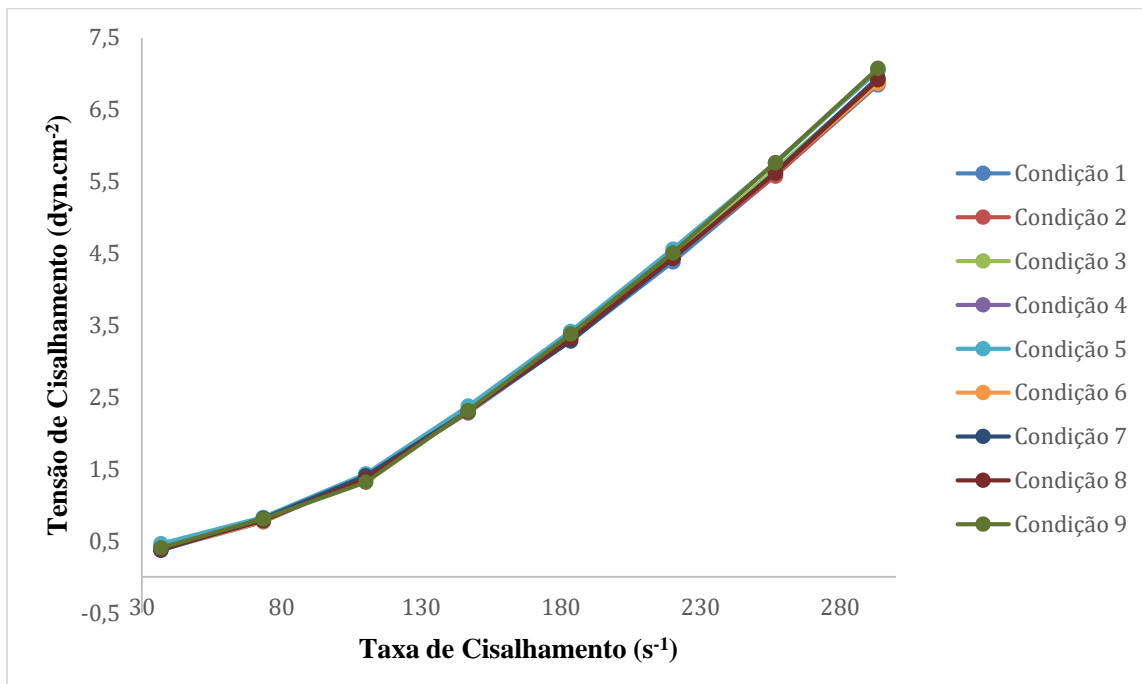
Fonte:O autor.

A partir dos resultados obtidos e com o auxílio do gráfico da Figura 22, percebe-se que os cultivos com o fator CFC ajustado em nível 3 ( $2g.L^{-1}$ ) atrelado a uma boa frequência de agitação, deram bons resultados de redução de DQO. Com aproximadamente 30% de redução, o cultivo 8 se mostrou eficaz para esse procedimento. As condições experimentais, que proporcionam altas concentrações de cultivo e uma boa produção de biomassa, também, demonstraram proporcionar uma boa redução de DQO, como já era esperado.

#### 4.5 REOLOGIA

O gráfico de tensão de cisalhamento em relação a taxa de cisalhamento para cada condição experimental está presente na Figura 23.

Figura 23 - Gráfico comparativo da reologia entre todas as condições experimentais.



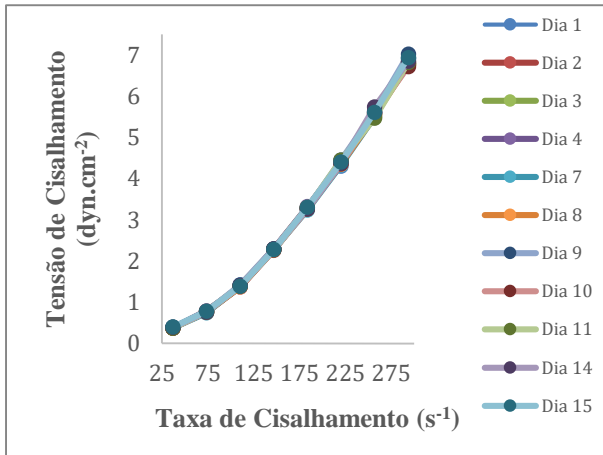
Fonte: O autor.

Avaliando as curvas reológicas do gráfico, pode-se afirmar que a suspensão de microalgas apresenta comportamento de um fluido não-newtoniano. Esta suspensão pode ser classificada como um líquido que apresenta um comportamento de fluxo dilatante, que é caracterizado pela dependência entre os parâmetros viscosidade e tensão de cisalhamento, no qual o valor da viscosidade aumenta a partir do aumento da taxa de cisalhamento. Segundo Holdsworth (1971), 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.

Os resultados da Figura 23 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*.

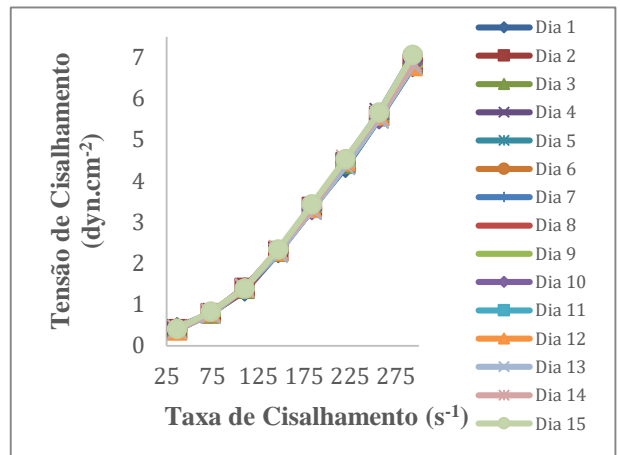
De modo a verificar a influência do tempo de cultivo no comportamento reológico da suspensão da microalga *Chlorella minutissima*, os gráficos da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação obtidos diariamente, nas diferentes condições do experimento, encontram-se nas Figuras 24 a 32.

Figura 27 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 1.



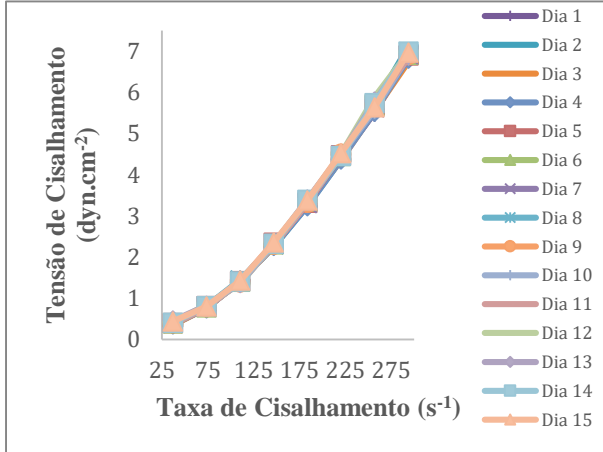
Fonte: O autor.

Figura 26 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 2.



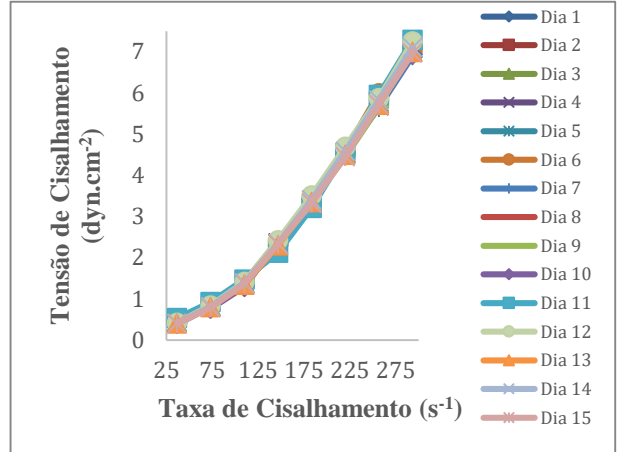
Fonte: O autor.

Figura 24 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 3.



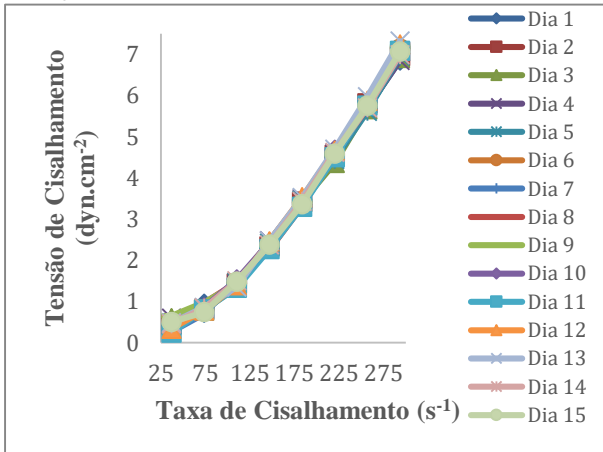
Fonte: O autor.

Figura 25 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 4.



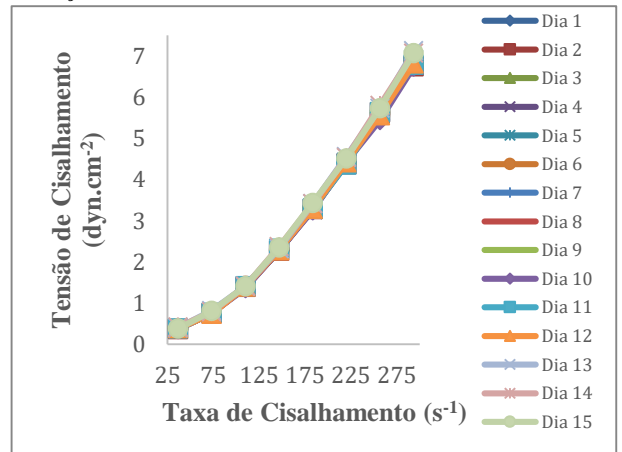
Fonte: O autor.

Figura 28 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 5.



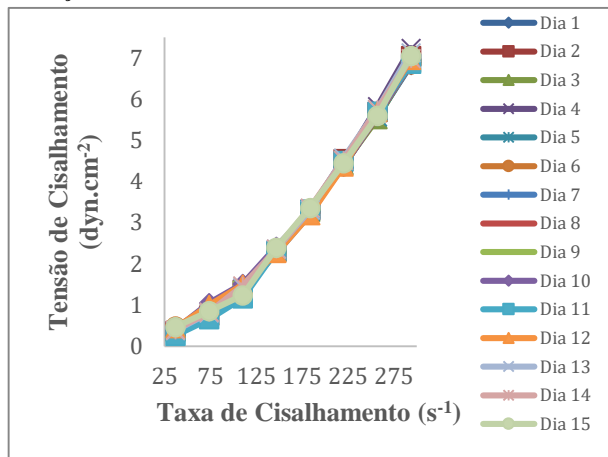
Fonte: O autor.

Figura 29 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 6.



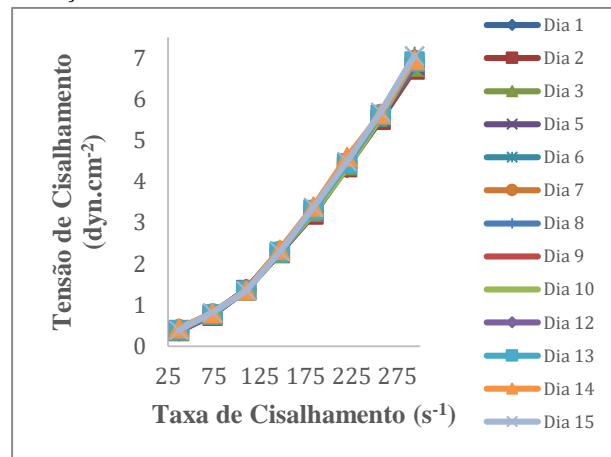
Fonte: O autor.

Figura 31 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 7.



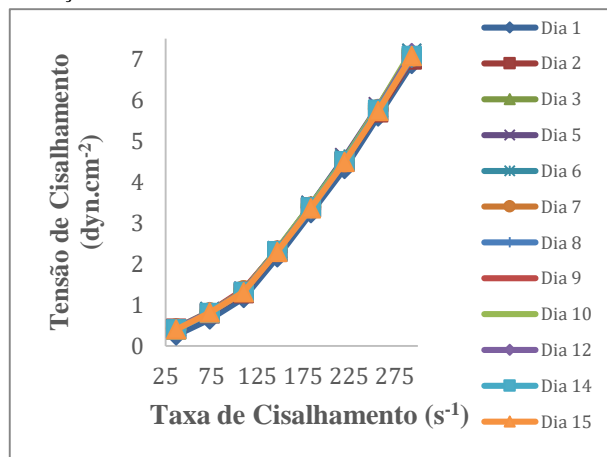
Fonte: O autor.

Figura 30 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 8.



Fonte: O autor.

Figura 32 - Gráfico comparativo entre os dias de cultivo da condição 9.



Fonte: O autor.

Dos gráficos das figuras 24 a 32, observa-se que o tempo de cultivo praticamente não exerceu influência nos reogramas da suspensão da microalga *Chlorella minutissima*, exceto nas condições 5 e 9, que apresentam uma boa taxa de crescimento microalgal e a frequência de agitação no nível 1 (4 rpm), condições estas que contribuem para maior sedimentação das partículas em suspensão.

#### 4.5.1 Modelos matemáticos ajustados ao comportamento reológico da suspensão da microalga *Chlorella minutissima* cultivada em reator *Raceway*

Quatro modelos matemáticos foram aplicados na análise reológica da suspensão de microalgas para averiguar qual se adequaria melhor ao comportamento deste fluido. As

equações utilizadas foram as dos modelos de Bingham, Casson, Lei da potência e Herschel-Bulkley e estão dispostas na Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação da confiança do ajuste entre os modelos matemáticos aplicados a análise reológica da suspensão da microalga *Chlorella minutissima*.

CONDIÇÃO	Confiança do Ajuste (%)			
	Bingham	Casson	Power Law	Herschel-Bulkley
1	73,27	87,34	92,59	99,92
2	73,57	87,19	92,01	99,91
3	73,59	87,15	92,01	99,92
4	72,26	85,35	91,72	99,81
5	73,78	86,27	89,72	99,83
6	73,69	87,36	92,58	99,93
7	72,53	86,87	92,10	99,91
8	72,88	87,14	92,25	99,90
9	70,95	86,05	90,72	99,89

Fonte: O autor.

Ao analisar a Tabela 14, pode-se afirmar que o modelo matemático que melhor se ajusta ao comportamento da suspensão das microalgas *Chlorella minutissima* é o Herschel-Bulkley com coeficiente de correlação próximo a 0,999. Isto reforça que a suspensão microalgal é caracterizada como não-Newtoniana, já que este modelo é o mais indicado para se utilizar para este tipo de fluido. O modelo Herschel-Bulkley é representado pela equação:

$$\tau = \tau^0 + k\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

No qual  $\tau$  é a tensão de cisalhamento,  $\tau_0$  é a tensão limite de escoamento (qual tensão precisa ser aplicada ao fluido para ele começar a escoar),  $k$  é o índice de consistência e  $n$  o índice de comportamento. Se  $n=1$  e  $\tau_0=0$ , o modelo se reduz ao modelo de um fluido newtoniano. Na Tabela 15, estão os valores médios dos parâmetros mencionados para cada condição experimental.

Tabela 15 - Parâmetros do modelo matemático Herschel-Bulkley para cada condição experimental de cultivo.

<b>Condição Experimental</b>	<b>k (cP)</b>	<b>n</b>	<b><math>\tau_0</math> (dyn/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>1</b>	0,0679	1,619	0,0903
<b>2</b>	0,0685	1,622	0,0991
<b>3</b>	0,0696	1,619	0,0980
<b>4</b>	0,0688	1,629	0,0923
<b>5</b>	0,0698	1,623	0,1168
<b>6</b>	0,0749	1,604	0,0726
<b>7</b>	0,0677	1,624	0,1006
<b>8</b>	0,0693	1,621	0,0809
<b>9</b>	0,0555	1,659	0,1183

Fonte: O autor.

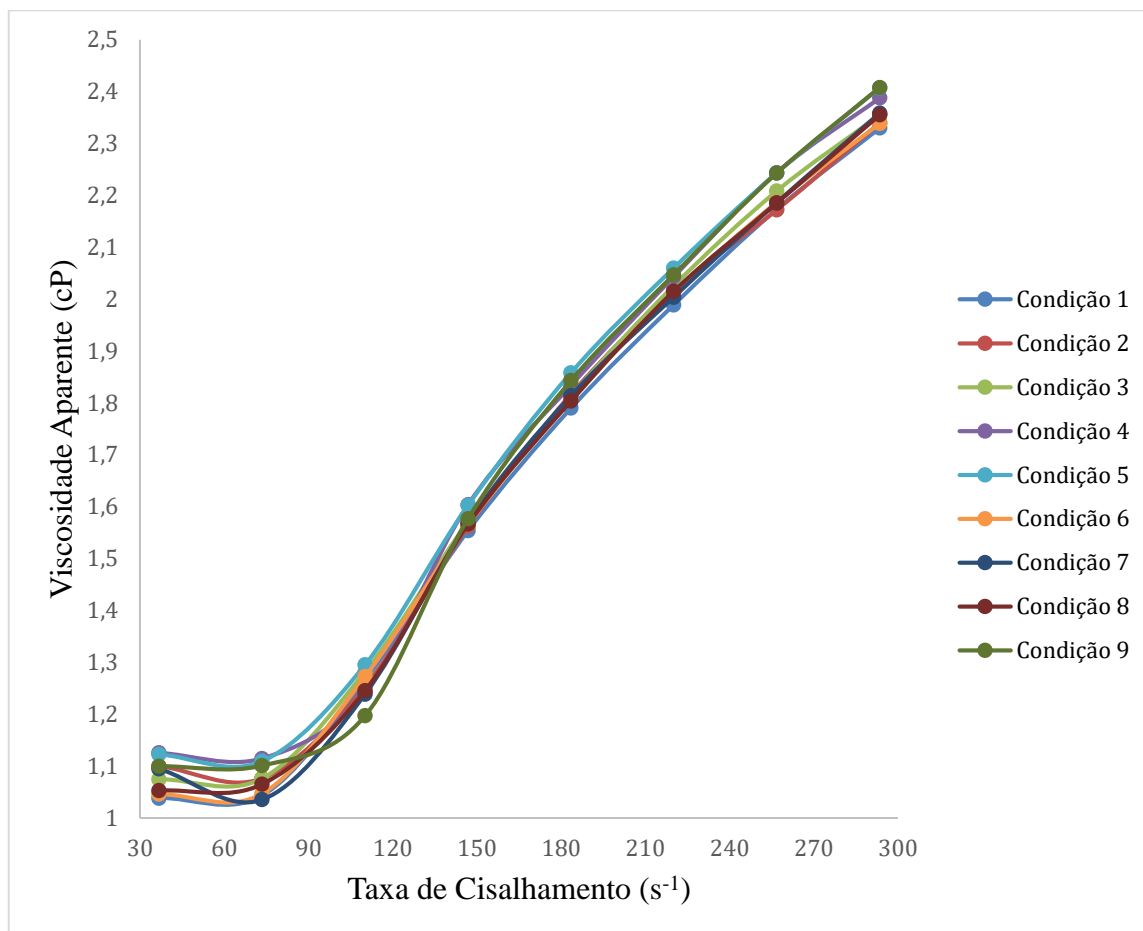
Com os dados da Tabela 15, percebe-se que a condição 9 gerou o menor valor de k (0,0555), enquanto a condição 6 gerou o maior valor (0,749). Isso significa que para a condição 6 a suspensão de microalgas se comporta como um fluido mais resistente ao escoamento do que para a condição 9. Já para os valores de n, o cultivo 6 foi o que gerou o menor valor e o 9 foi o que gerou o maior valor. Deste modo, a suspensão microalgal cultivada na condição 6 tende a ser um fluido com comportamento mais próximo de um fluido newtoniano, que o cultivado na condição 9. Por último, o cultivo com menor valor de  $\tau_0$  foi o cultivo 6 e o maior, foi o cultivo 9. Quanto mais próximo o valor de  $\tau_0$  for de 0, mais o fluido se aproxima do comportamento de um fluido newtoniano.

#### 4.5.2 Viscosidade Aparente

Os gráficos da viscosidade aparente em função da taxa de deformação obtidos nas diferentes condições do experimento encontram-se na Figura 33.



Figura 33 - Gráfico da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento.



Fonte: O autor.

Da Figura 33, observa-se que a viscosidade aparente da suspensão da microalga *Chlorella minutissima* aumentou a medida que houve um aumento na frequência de rotação a que a amostra foi submetida (que é diretamente proporcional à taxa de deformação), em todos os casos a partir de, aproximadamente 75rpm. Estes resultados estão coerentes com diversos autores, para suspensões de algas em geral, que apresentam comportamento reológico de fluido dilatante e, uma explicação para este tipo de comportamento é que, à medida que a tensão de cisalhamento aumenta, o líquido intersticial que lubrifica a fricção entre as partículas é incapaz de preencher os espaços, devido a um aumento no volume que frequentemente acompanha o fenômeno, ocorrendo contato direto entre as partículas sólidas, fazendo com que a viscosidade aparente aumente (TISCHER, 2006).

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; DAMIEN; MALCOLM, 2012; WILEMAN; OZKAN; BERBEROGLU, 2012; PELEGRINE; SILVA; LOURES, 2016).

Lira (2011), ao analisar o comportamento reológico da *Chlorella minutissima* verificou comportamento não-newtoniano dilatante, quando cultivada em *Erlenmeyers* 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, Silva e Loures (2016), também 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  $\mu\text{m}$ ) 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. 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). Ainda, no mesmo estudo, os autores constataram que os cultivos da microalga *Chlorella sp.* sem a suplementação de acetato contribui para maior sedimentação das partículas orgânicas suspensas. Ou seja, a concentração da fonte de carbono no cultivo das microalgas influencia nas interações das partículas orgânicas com a fase contínua às quais, por sua vez, influenciam na viscosidade e até mesmo no comportamento reológico da suspensão.

Por outro lado, Wileman, Ozkan e Berberoglu (2012) concluíram que o comportamento newtoniano em cultivos das microalgas *Nannochloris sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricornutum* em concentrações inferiores a 20  $\text{kg}/\text{m}^3$ . No entanto, a partir de 60  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 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  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

Adesanya, Damien e Malcolm (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. Ainda em relação a Figura 33, observa-se que a condição experimental 9, que apresentou alta concentração celular e possui CFC ajustado no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), também foi a condição que apresentou os maiores valores de viscosidade aparente, ao passo que a condição 1, que apresentou a menor concentração de células e possui ausência de CFC no cultivo, também foi a condição que apresentou os menores valores de viscosidade. Deste modo, comprova-se que os resultados corroboram com os demais trabalhos mencionados.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após apresentar os resultados de cada análise com abordagem de alguns aspectos pontuais pertinentes, torna-se necessário analisar cada aspecto do cultivo mais a fundo. Para tal, foi efetuada a análise estatística da matriz experimental - baseada nos arranjos ortogonais de Taguchi - e, deste modo, pôde-se elencar a significância ou relevância de cada fator (concentração de chorume, concentração da fonte de carbono, vazão de aeração e frequência de agitação), quando houve, a partir da ferramenta de análise de variância (ANOVA), nas respostas. Para propor as melhores condições de ajuste, visando otimizar a resposta pretendida ou o processo como um todo e diminuir a variabilidade, fez-se o cálculo dos efeitos dos fatores sobre a variável resposta para a média e para a razão sinal-ruído. Para o cálculo dos efeitos dos fatores, foram utilizados o Statistica 13.5 e o Minitab 19 e para a ANOVA, foi utilizado o Excel 2016. O critério de avaliação da significância adotado, foi o teste F e a tabela dos valores de  $F_{\text{crítico}}$  estão no ANEXO A.

##### 4.6.1 Crescimento celular dos cultivos

A análise estatística para avaliar o crescimento celular, foi feita considerando os valores de concentração final que cada cultivo atingiu. A Tabela 16 contém a matriz experimental e os resultados obtidos em termos de crescimento celular para cada condição experimental.

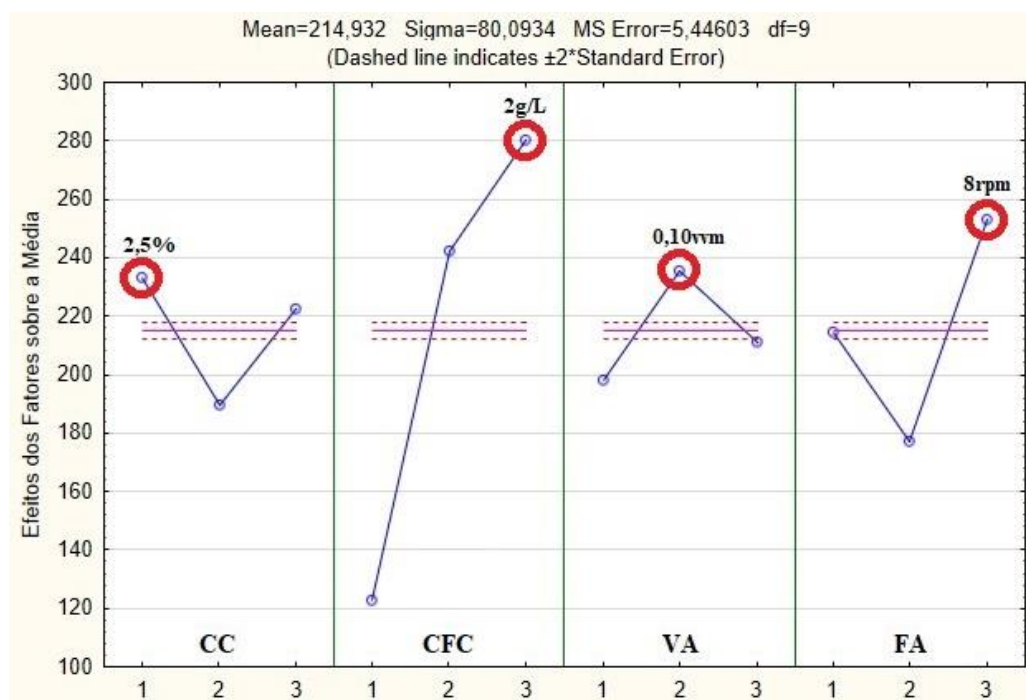
Tabela 16 - Matriz ortogonal da resposta em termos de obtenção de biomassa total dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais.

Condição Experimental	Fatores				Resposta		Média	S/N
	CC	CFC	VA	FA				
1	1	1	1	1	122,91	124,40	123,66	41,84
2	1	2	2	2	245,03	241,10	243,06	47,71
3	1	3	3	3	335,44	330,10	332,77	50,44
4	2	1	2	3	153,83	156,70	155,27	43,82
5	2	2	3	1	211,37	214,40	212,88	46,56
6	2	3	1	2	198,06	202,20	200,13	46,02
7	3	1	3	2	88,08	88,67	88,37	38,93
8	3	2	1	3	268,90	272,30	270,60	48,65
9	3	3	2	1	306,48	308,80	307,64	49,76

Fonte: O autor.

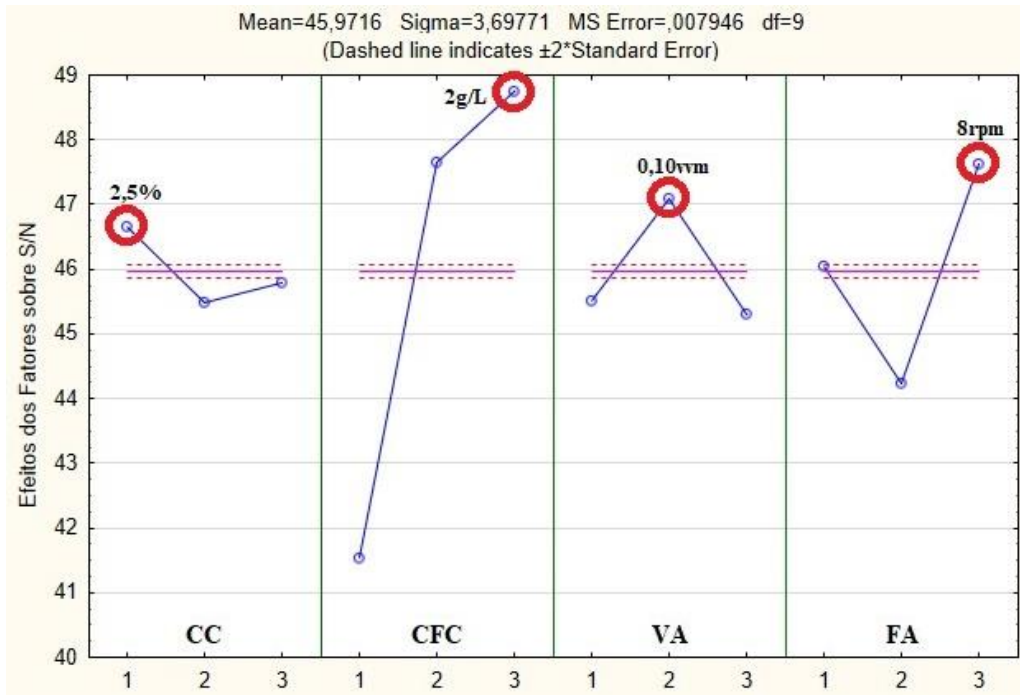
A partir dos valores de resposta obtidos e dispostos na Tabela 16, foram calculados os efeitos dos fatores tanto em relação a média, quanto em relação a razão sinal-ruído, visando a maximização da concentração final (maior é melhor). Os gráficos das Figuras 34 e Figura 35 representam o resultado do melhor ajuste obtido de acordo com os valores dos efeitos calculados.

Figura 34 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de concentração final do cultivo.



Fonte: O autor.

Figura 35 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de concentração final do cultivo.



Fonte: O autor.

Ao analisar os gráficos dos efeitos, observa-se que, tanto para a maximização da resposta em termos de concentração final, quanto para a redução de variabilidade do processo, o fator CC deve ser ajustado no nível 1 (2,5%), CFC deve ser ajustado no nível 3 ( $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), VA deve ser ajustado no nível 2 (0,10vvm) e FA deve ser ajustado no nível 3 (8rpm).

Buscando aprofundar e tornar a análise mais eficaz, a análise de variância (ANOVA) foi realizada e o resultado para um  $\alpha$  de 0,05 (95% de confiança) está apresentado na Tabela 17 em relação à média e na Tabela 18 em relação a razão sinal-ruído.

Tabela 17 - ANOVA para a média em termos de concentração final do cultivo.

Fonte de Variação	SQ	gl	SMQ	F
A	3107,41	2	1553,71	1,46
B	40668,70	2	20334,35	19,07
C	2133,03	2	1066,52	1,00
D	8593,72	2	4296,86	4,03
Erro	0	0	-	-
Erro Ajustado	2133,03	2	1066,52	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

Tabela 18 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de concentração final do cultivo.

Fonte de Variação	SQ	gl	SMQ	F
A	2,32	2	1,16	1,00
B	90,57	2	45,29	39,06
C	5,77	2	2,89	2,49
D	17,52	2	8,76	7,56
Erro	0	0	-	-
Erro Ajustado	2,32	2	1,16	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

A partir da análise da Tabela 17 da ANOVA para a média e para um valor de F crítico tabelado de 19, tem-se que apenas o fator CFC é significativo e o fator FA é relevante segundo o critério de Padke ( $F > 2$ ). Já ao analisar a Tabela 18 da ANOVA para a razão sinal-ruído para o mesmo valor de F, tem-se que apenas o fator CFC é significativo e os fatores VA e FA são relevantes. Deste modo, o fator mais impactante na resposta em termos de concentração final dos cultivos de microalga *Chlorella minutissima* em reator *Raceway* para as condições do presente trabalho é o fator concentração da fonte de carbono (acetato), que deve ser ajustado no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) para maximizar a resposta e diminuir a variabilidade, como já mencionado anteriormente. O fator FA, também, deve ser ajustado no nível 3 (8rpm) de modo a maximizar a resposta e os fatores CC e VA, podem ser ajustados da maneira que for mais conveniente, já que são os que menos impactam no valor da resposta. Assim, a condição de cultivo 3 mantém-se como a melhor condição, comprovada pelos valores de obtenção de concentração final, enquanto que as condições 1 e 7, com os ajustes do fator CFC no nível 1, geram os menores valores da resposta. Em seus trabalhos, Mitra, Van Leeuwen e Lamsal (2012) e Abedini Najafabadi *et al.* (2015), perceberam que a fonte de carbono (acetato) tinha um efeito muito forte no aceleração do crescimento de biomassa de microalgas. Já Singh e Dhar (2011), constataram a importância da agitação em evitar a sedimentação das células do cultivo, mantendo-as em suspensão e, assim, proporcionando uma exposição uniforme de luz em todas as células, aumentando a transferência de massa para reduzir o gradiente de nutriente na cultura e na homogeneização do meio.

#### 4.6.2 Biomassa total obtida

A Tabela 19 contém a matriz experimental e os resultados obtidos em termos de biomassa total produzida no cultivo para cada condição experimental.

Tabela 19 - Matriz ortogonal da resposta em termos de obtenção de biomassa total dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais.

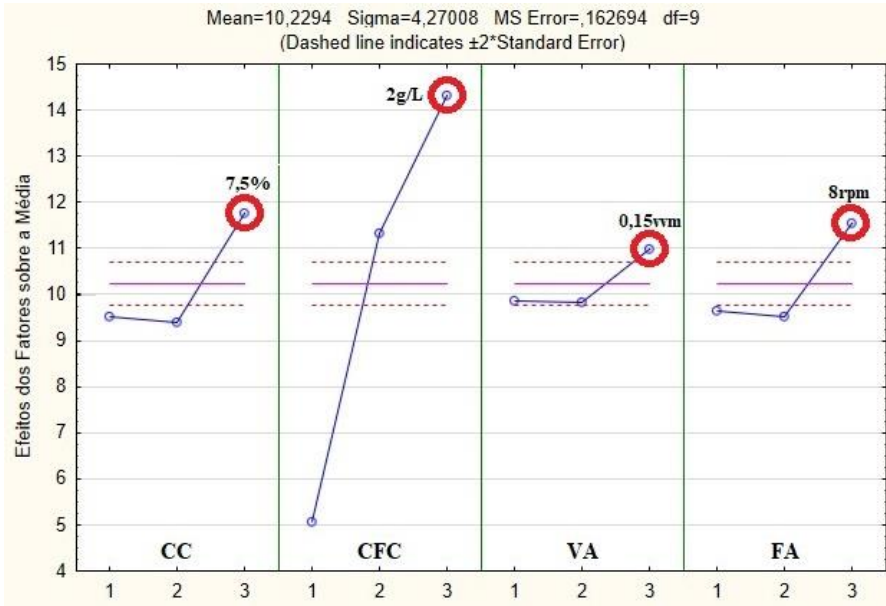
Condição Experimental	Fatores				Biomassa Obtida (g)		Média	S/N
	CC	CFC	VA	FA				
1	1	1	1	1	3,12	3,67	3,395	10,53
2	1	2	2	2	9,71	9,28	9,495	19,54
3	1	3	3	3	15,30	16,02	15,660	23,89
4	2	1	2	3	5,01	5,32	5,165	14,25
5	2	2	3	1	10,18	11,08	10,630	20,51
6	2	3	1	2	12,07	12,73	12,400	21,86
7	3	1	3	2	6,33	6,98	6,655	16,43
8	3	2	1	3	14,99	14,72	14,855	23,44
9	3	3	2	1	16,51	16,28	16,395	24,29

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação.

Fonte: O autor.

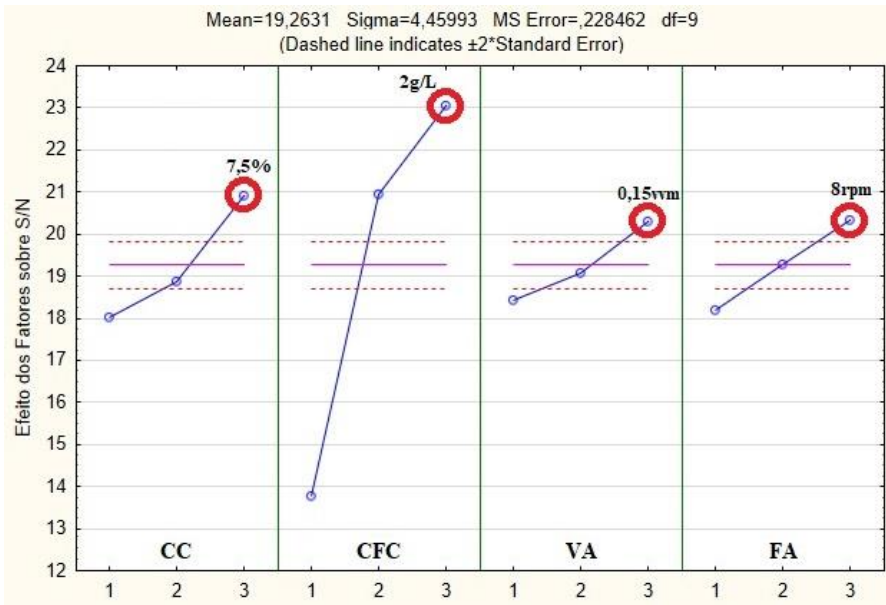
A partir dos valores de resposta obtidos e dispostos na Tabela 19, foram calculados os efeitos dos fatores tanto em relação a média, quanto em relação a razão sinal-ruído, visando a maximização da obtenção de biomassa total (maior é melhor). Os gráficos das Figuras 36 e Figura 37 representam o resultado do melhor ajuste obtido de acordo com os valores dos efeitos calculados.

Figura 36 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de obtenção de biomassa total.



Fonte: O autor.

Figura 37 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de obtenção de biomassa total.



Fonte: O autor.

Ao analisar os gráficos dos efeitos, observa-se que, tanto para a maximização da resposta em termos de obtenção de biomassa total, quanto para a redução de variabilidade do processo, todos os fatores devem ser ajustados no nível 3.



Buscando aprofundar e tornar a análise mais eficaz, a análise de variância (ANOVA) foi realizada e o resultado para um  $\alpha$  de 0,05 (95% de confiança) está apresentado na Tabela 20 em relação à média e na Tabela 21 em relação a razão sinal-ruído.

Tabela 20 - ANOVA para a média em termos de obtenção de biomassa total.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	20,21	2	10,11	20,21
CFC	148,38	2	74,19	148,33
VA	1,00	2	0,50	1,00
FA	9,11	2	4,56	9,11
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	1,00	2	0,50	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

Tabela 21 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de obtenção de biomassa total.

Fonte de Variação	SQ	gl	SMQ	F
CC	18,66	2	9,33	4,46
CFC	152,25	2	76,12	36,41
VA	4,18	2	2,09	1,00
FA	6,58	2	3,29	1,57
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	4,18	2	2,09	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

A partir da análise da Tabela 20 da ANOVA para a média e para um valor de F crítico tabelado de 19, tem-se que os fatores CFC e CC são significantes e o fator FA é relevante segundo o critério de Padke ( $F > 2$ ). Já ao analisar a Tabela 21 da ANOVA para a razão sinal-ruído para o mesmo valor de F, tem-se que apenas o fator CFC é significativo e o fator CC é relevante. Deste modo, o fator mais impactante na resposta em termos de biomassa total dos cultivos de microalga *Chlorella minutissima* em reator *Raceway* para as condições do presente trabalho é o fator concentração da fonte de carbono (acetato), que deve ser ajustado no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) para maximizar a resposta e diminuir a variabilidade, como já mencionado anteriormente. O fator CC, também, deve ser ajustado no nível 3 (7,5%) de modo a

maximizar a resposta e os fatores VA e FA, podem ser ajustados da maneira que for mais conveniente, já que são os que menos impactam no valor da resposta. Assim, as condições de cultivo 3, 6, 8 e 9 mantêm-se como as melhores condições, comprovadas pelos valores de obtenção de biomassa total, enquanto que as condições 1, 4 e 7, com os ajustes do fator CFC no nível 1, geram os menores valores da resposta. Os resultados estão de acordo com diversos autores. O uso da fonte de carbono promovendo um cultivo mixotrófico já se mostrou bastante eficaz no aumento da concentração de células microalgais e em melhores rendimentos, em termos de obtenção de biomassa, se comparado ao cultivo fotoautotrófico. Já em relação ao chorume, sabe-se que o lixiviado apresenta boa parte dos nutrientes necessários para a célula de microalga se desenvolver, sobretudo nitrato e fosfato. Apesar da toxicidade, por apresentar metais pesados em sua composição, quando utilizado em concentrações ótimas ou combinado com altas concentrações de acetatos ao formarem o meio de cultivo, os resultados são os melhores possíveis.

#### 4.6.3 Produtividade de biomassa

A matriz experimental e os resultados obtidos em termos de produtividade de biomassa para cada condição experimental está disposto na Tabela 22.

Tabela 22 - Matriz ortogonal da resposta em termos de produtividade de biomassa dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais.

Condição Experimental	Fatores				Produtividade de Biomassa (mg.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )		Média	S/N
	CC	CFC	VA	FA				
1	1	1	1	1	20,80	24,47	22,63	27,01
2	1	2	2	2	64,73	61,87	63,30	36,02
3	1	3	3	3	102,00	106,80	104,40	40,37
E4	2	1	2	3	33,40	35,47	34,43	30,73
5	2	2	3	1	67,87	73,87	70,87	36,99
6	2	3	1	2	80,47	84,87	82,67	38,34
7	3	1	3	2	42,20	46,53	44,37	32,91
8	3	2	1	3	99,93	98,13	99,03	39,91
9	3	3	2	1	110,07	108,53	109,30	40,77

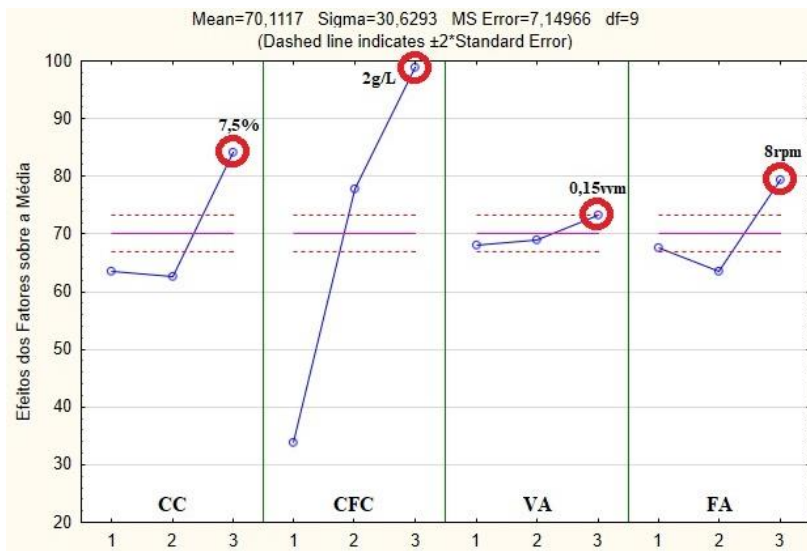
Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação.

Fonte: O autor.

A partir dos valores de resposta obtidos e dispostos na Tabela 22, foram calculados os efeitos dos fatores tanto em relação a média, quanto em relação a razão sinal-ruído, visando

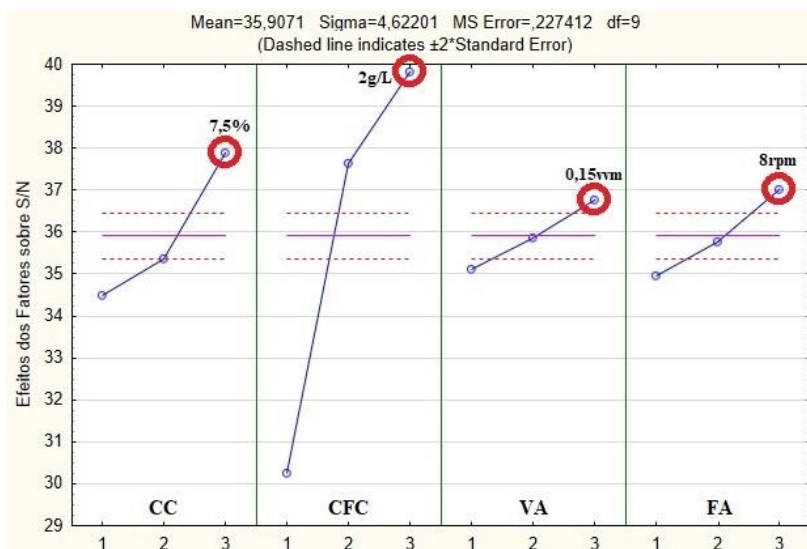
a maximização da produtividade de biomassa (maior é melhor). Os gráficos das Figuras 38 e Figura 39 representam o resultado do melhor ajuste obtido de acordo com os valores dos efeitos calculados.

Figura 38 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de produtividade de biomassa.



Fonte: O autor.

Figura 39 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de produtividade de biomassa.



Fonte: O autor.

Analisando os resultados em relação a média percebe-se que para maximizar a produtividade em biomassa deve-se ajustar todos os fatores no nível 3. Porém, pode-se

observar que o fator CC e o fator FA, se ajustados no nível 2, fornece os piores resultados em termos de produtividade de biomassa, até menores do que se ajustados no nível baixo, principalmente para FA. Isto não era tão visível no gráfico dos efeitos para a biomassa total, apesar de, também, apresentar esse fato.

Também, para a razão sinal-ruído, tem-se que o melhor ajuste é para todos os fatores ajustados no nível 3.

Dando continuidade a análise, foi feita a ANOVA, que está representada pela Tabela 23 para a média e pela Tabela 24 para a razão sinal-ruído.

Tabela 23 - ANOVA para a média em termos de produtividade de biomassa.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	898,40	2	449,20	20,21
CFC	6594,61	2	3297,30	148,33
VA	44,46	2	22,23	1,00
FA	404,95	2	202,47	9,11
Erro	0,00	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	44,46	2	22,23	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

Tabela 24 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de produtividade de biomassa.

Fonte de Variação	SQ	gl	SMQ	F
CC	18,66	2	9,33	4,46
CFC	152,25	2	76,12	36,41
VA	4,18	2	2,09	1,00
FA	6,58	2	3,29	1,57
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	4,18	2	2,09	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

A partir da análise da Tabela 23 da ANOVA para a média e para um valor de F crítico tabelado de 19, tem-se que os fatores CFC e CC são significantes e o fator FA é relevante. Já ao analisar a Tabela 24 da ANOVA para a razão sinal-ruído e para o mesmo valor de F,

tem-se que apenas o fator CFC é significativo e o fator CC é relevante. Deste modo, o fator mais impactante na resposta em termos de produtividade de biomassa dos cultivos de microalga *Chlorella minutissima* em reator *Raceway* para as condições do presente trabalho é o fator concentração da fonte de carbono (acetato), que deve ser ajustado no nível 3 (2g.L<sup>-1</sup>) para maximizar a resposta e diminuir a variabilidade, como já mencionado anteriormente. O fator CC, também, deve ser ajustado no nível 3 (7,5%) de modo a maximizar a resposta e os fatores VA e FA, podem ser ajustados da maneira que for mais conveniente, já que são os que menos impactam no valor da resposta. Assim, as condições de cultivo 3, 6, 8 e 9 mantêm-se como as melhores condições, comprovadas pelos valores de obtenção de produtividade de biomassa, enquanto que as condições 1, 4 e 7, com os ajustes do fator CFC no nível 1, geram os menores valores da resposta.

#### 4.6.4 Teor de lipídeos

A matriz experimental e os resultados obtidos em termos de teor de lipídeos para cada condição experimental está disposto na Tabela 25.

Tabela 25 - Matriz ortogonal da resposta em termos de teor de lipídeos dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais.

Condições de Cultivo	Fatores				Teo de Lipídeos (%)		Média	S/N
	CC	CFC	VA	FA				
1	1	1	1	1	2,88	2,75	2,815	8,98
2	1	2	2	2	3,12	2,88	2,999	9,52
3	1	3	3	3	5,12	4,94	5,034	14,03
4	2	1	2	3	4,32	4,18	4,248	12,56
5	2	2	3	1	4,34	4,44	4,387	12,84
6	2	3	1	2	5,20	5,44	5,321	14,51
7	3	1	3	2	4,51	4,76	4,634	13,31
8	3	2	1	3	5,91	5,77	5,839	15,32
9	3	3	2	1	7,48	7,36	7,420	17,41

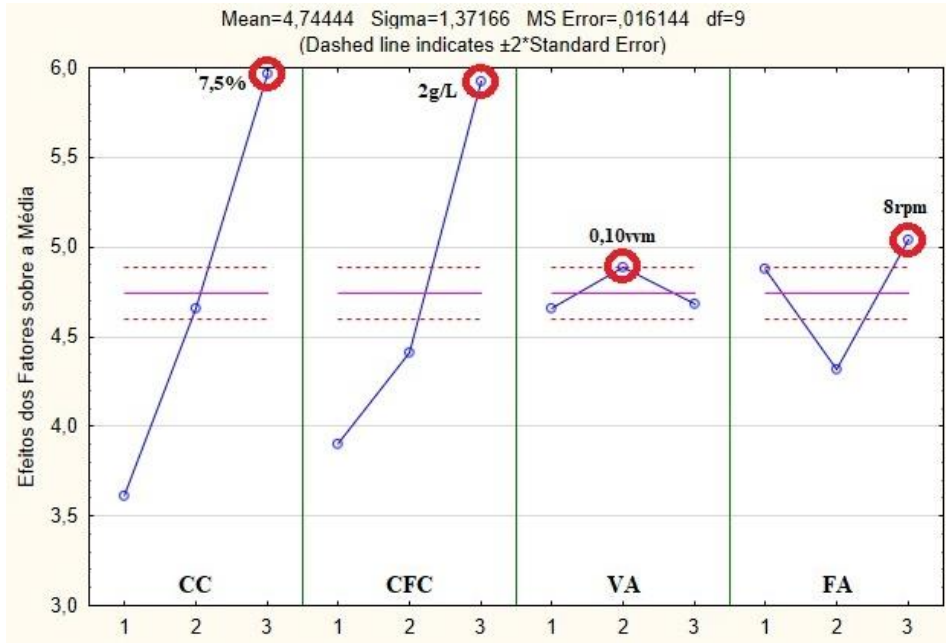
Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação.

Fonte: O autor.

A partir dos valores de resposta obtidos e dispostos na Tabela 25, foram calculados os efeitos dos fatores tanto em relação a média, quanto em relação a razão sinal-ruído, visando a maximização da resposta teor de lipídeos (maior é melhor). Os gráficos das Figuras 40 e

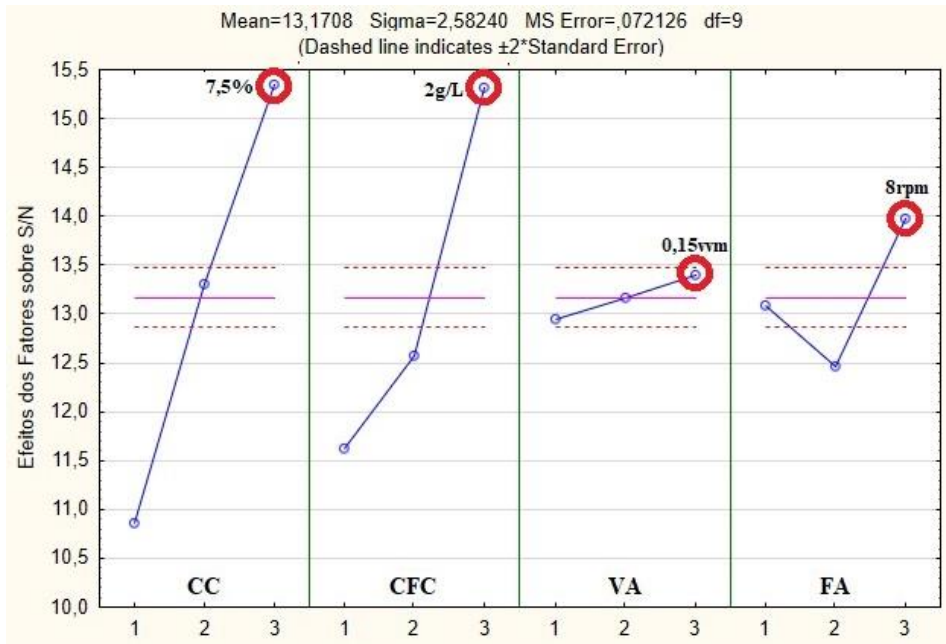
Figura 41 representam o resultado do melhor ajuste obtido de acordo com os valores dos efeitos calculados.

Figura 40 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de teor de lipídeos.



Fonte: O autor.

Figura 41 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de teor de lipídeos.



Fonte: O autor.

Analisando os resultados, tanto em relação a média, quanto para a razão sinal-ruído, percebe-se que para maximizar o teor de lipídeos deve-se ajustar todos os fatores no nível 3. Porém, o ajuste de nível para a VA não influencia consideravelmente na resposta, uma vez que todos os pontos de nível ficam dentro de um mesmo intervalo.

Dando continuidade a análise, foi feita a ANOVA, que está representada pela Tabela 26 para a média e pela Tabela 27 para a razão sinal-ruído.

Tabela 26 - ANOVA para a média em termos de teor de lipídeos.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	8,31	2	4,15	86,84
CFC	6,66	2	3,33	69,64
VA	0,10	2	0,05	1,00
FA	0,86	2	0,43	8,98
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	<b>0,10</b>	<b>2</b>	<b>0,05</b>	<b>-</b>

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

Tabela 27 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de teor de lipídeos.

Tabela ANOVA				
Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	30,49	2	15,25	98,41
CFC	22,18	2	11,09	71,60
VA	0,31	2	0,15	1,00
FA	3,53	2	1,77	11,39
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	<b>0,31</b>	<b>2</b>	<b>0,15</b>	<b>-</b>

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

A partir da análise da Tabela 26 da ANOVA para a média e para um valor de F crítico tabelado de 19, tem-se que os fatores CC e CFC são significantes e o fator FA é relevante. Essa conclusão se repete ao analisar a Tabela 27 da ANOVA para a razão sinal-ruído e para o mesmo valor de F. Deste modo, o fator mais impactante na resposta em termos de teor de lipídeos dos cultivos de microalga *Chlorella minutissima* em reator *Raceway* para as condições do presente trabalho é o fator concentração de chorume, que deve ser ajustado no

nível 3 (7,5%) para maximizar a resposta e diminuir a variabilidade. O fator CFC, também, deve ser ajustado no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) de modo a maximizar a resposta e os fatores VA e FA, podem ser ajustados da maneira que for mais conveniente, já que são os que menos impactam no valor da resposta. Assim, as condições de cultivo 6, 8 e 9 mantêm-se como as melhores condições, comprovadas pelos valores de obtenção de teor de lipídeos, enquanto que as condições 1, 2 e 4, com os ajustes do fator CC e CFC nos níveis 1 (2,5%) e 2 ( $1\text{g.L}^{-1}$ ), geram os menores valores da resposta.

Segundo Huang *et al.* (2010), as microalgas sintetizam lipídeos a partir das fontes de carbono, sejam elas orgânicas (acetato, glicerina) ou inorgânicos ( $\text{CO}_2$ ). Com relação ao efeito da concentração do  $\text{CO}_2$  na corrente de aeração, Antonio (2014) afirma que o fato do  $\text{CO}_2$  estar presente no ar atmosférico em baixa concentração, pode limitar o crescimento rápido, uma vez que o carbono corresponde à cerca de 45% da biomassa das microalgas. O autor, ao avaliar o efeito da concentração do  $\text{CO}_2$  na produção lipídica de *Chlorella vulgaris*, constatou que, para que elevadas taxas de crescimento possam ser alcançadas, esse carbono geralmente necessita ser suplementado. No entanto, a influência do teor de  $\text{CO}_2$  na corrente gasosa vai depender fortemente da espécie microalgal, tanto no que diz respeito à produtividade em biomassa quanto ao teor de lipídeos e à composição em ácidos graxos (CHIU *et al.*, 2015). Abedini Najafabadi *et al.* (2015), avaliaram o efeito do uso de diversos tipos de fontes de carbono (orgânicas e inorgânicas) na produção celular, acúmulo de lipídeos e produção de ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*. Dentre as fontes de carbono testadas, o uso de acetato de sódio, em um cultivo com baixa concentração de nitrato, foi o que apresentou o maior teor de lipídeos.

Os resultados obtidos são coerentes já que os cultivos com ajuste de CFC no nível 3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ), obtiveram os melhores resultados. As concentrações de nitrato no chorume são extremamente baixas, o que explica o fato da análise estatística caminhar para um resultado no qual CC deve ser ajustado em nível 3 (7,5%), o que vai de encontro com a literatura, já que estudos indicam que os melhores rendimentos em lipídeos são em condições com baixa concentração de nitrato e alta concentração de acetato. Brito (2014), encontrou valores de concentração de nitrato próximos a  $2,1\text{mg.L}^{-1}$  em estudo de caracterização do chorume proveniente do aterro sanitário do município de Cachoeira Paulista (o mesmo utilizado neste estudo). O resultado completo da caracterização, encontra-se no ANEXO B.

Landazábal *et al.* (2013), em estudo utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*, obtiveram os maiores rendimentos em lipídeos na concentração de 10mM (milimol) de



acetato de sódio e 1,47mM de nitrato de sódio em cultivos realizados em reator *Air-lift*, com volume de 2L e alimentação de aeração de 2L.min<sup>-1</sup>. Ainda, no mesmo estudo, ao analisar os resultados tem-se fortes indícios de que possa haver uma possível interação entre os fatores CC e CFC, já que apesar de os dois serem favoráveis ao cultivo, eles influenciam as produções de biomassa e lipídeos hora para bom hora para ruim, dependendo da proporção em que são combinados. O resultado obtido nesse estudo, está disponível no ANEXO C.

#### 4.6.5 Produtividade média de lipídeos

A matriz experimental e os resultados obtidos em termos de produtividade média de lipídeos para cada condição experimental está disposto na Tabela 28.

Tabela 28 - Matriz ortogonal da resposta em termos de produtividade de lipídeos dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais.

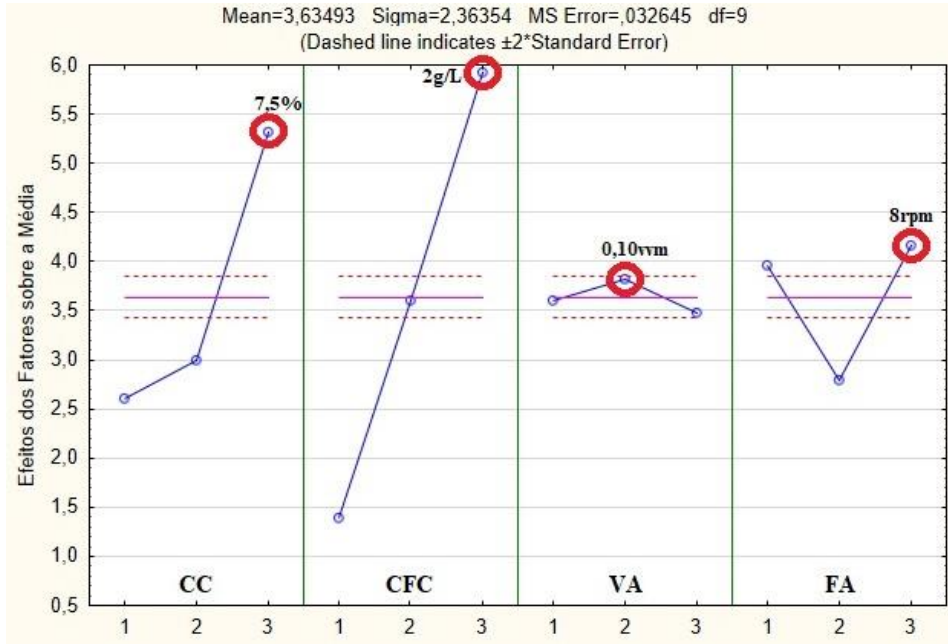
Condições de Cultivo	Fatores				Produtividade Média de Lipídeos (mg.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )		Média	S/N
	CC	CFC	VA	FA				
1	1	1	1	1	0,5986	0,6734	0,636	3,98
2	1	2	2	2	2,0199	1,7799	1,900	5,52
3	1	3	3	3	5,2261	5,2800	5,253	14,41
4	2	1	2	3	1,4430	1,4811	1,462	3,30
5	2	2	3	1	2,9438	3,2764	3,110	9,82
6	2	3	1	2	4,1828	4,6199	4,401	12,84
7	3	1	3	2	1,9028	2,2141	2,058	6,20
8	3	2	1	3	5,9069	5,6589	5,783	15,24
9	3	3	2	1	8,2330	7,9881	8,111	18,18

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação.

Fonte: O autor.

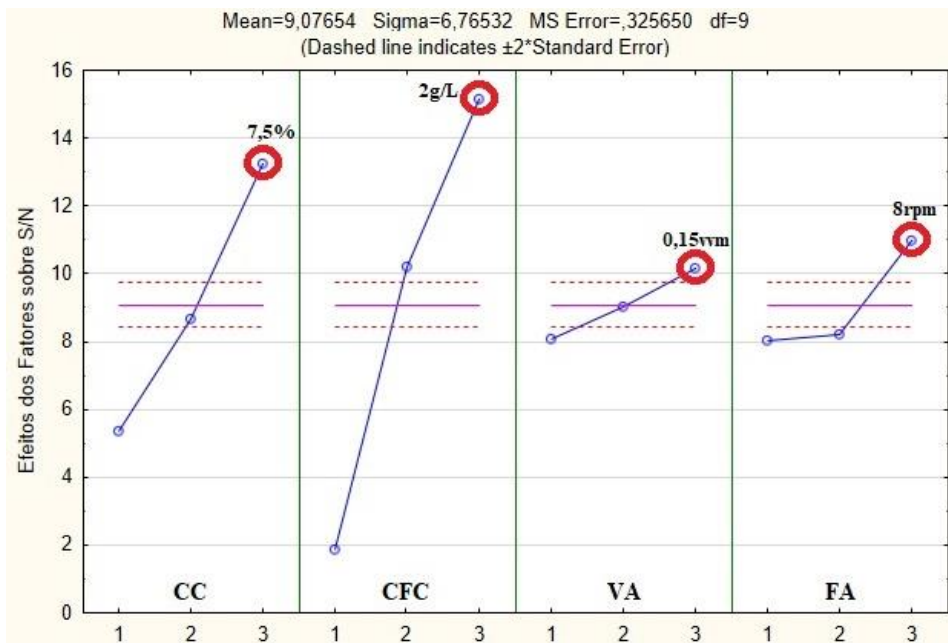
A partir dos valores de resposta obtidos e dispostos na Tabela 28, foram calculados os efeitos dos fatores tanto em relação a média, quanto em relação a razão sinal-ruído, visando a maximização da produtividade média de lipídeos (maior é melhor). Os gráficos das Figuras 42 e Figura 43 representam o resultado do melhor ajuste obtido de acordo com os valores dos efeitos calculados.

Figura 42 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de produtividade média de lipídeos.



Fonte: O autor

Figura 43 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de produtividade média de lipídeos.



Fonte: O autor.

Analisando os resultados, tanto em relação a média, quanto para a razão sinal-ruído, percebe-se que para maximizar a produtividade média de lipídeos deve-se ajustar todos os fatores no nível 3. Dando continuidade a análise, foi feita a ANOVA, que está representada pela Tabela 29 para a média e pela Tabela 30 para a razão sinal-ruído.

Tabela 29 - ANOVA para a média em termos de produtividade média de lipídeos.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	1297,06	2	648,53	69,13
CFC	3087,10	2	1543,55	164,54
VA	18,76	2	9,38	1,00
FA	330,73	2	165,36	17,63
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	<b>18,76</b>	<b>2</b>	<b>9,38</b>	<b>-</b>

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

Tabela 30 - ANOVA para a razão sinal ruído em termos de produtividade média de lipídeos.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	94,02	2	47,01	14,08
CFC	271,24	2	135,62	40,62
VA	6,68	2	3,34	1,00
FA	16,69	2	8,34	2,50
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	<b>6,68</b>	<b>2</b>	<b>3,34</b>	<b>-</b>

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

A partir da análise da Tabela 29 da ANOVA para a média e para um valor de F crítico tabelado de 19, tem-se que os fatores CFC e CC são significantes e o fator FA é relevante. Já ao analisar a Tabela 30 da ANOVA para a razão sinal-ruído e para o mesmo valor de F crítico, percebe-se que apenas o fator CFC é significativo, enquanto que os fatores CC e FA são relevantes, porém com o valor de F calculado para CC bem maior do que o de FA. Deste modo, o fator mais impactante na resposta em termos de produtividade média de lipídeos dos cultivos de microalga *Chlorella minutissima* em reator *Raceway* para as condições do presente trabalho é o fator concentração da fonte de carbono, que deve ser ajustado no nível

3 ( $2\text{g.L}^{-1}$ ) para maximizar a resposta e diminuir a variabilidade. O fator CC, também, deve ser ajustado no nível 3 (7.5%) de modo a maximizar a resposta e os fatores VA e FA, podem ser ajustados da maneira que for mais conveniente, já que são os que menos impactam no valor da resposta. Lembrando que para os cálculos médios de produtividade, foram considerados os valores obtidos de biomassa total para a extração, logo o fator mais impactante na resposta para biomassa - o CFC- , também, será importante para a resposta em produtividade, já que quanto mais biomassa o cultivo gerar, mais lipídeo poderá ser extraído. Deste modo, o ajuste no nível alto da CFC é imprescindível para este caso.

Assim, as condições de cultivo 3, 8 e 9 são as melhores condições, comprovadas pelos valores de obtenção de produtividade média de lipídeos, enquanto que as condições 1, 2 e 4, com os ajustes do fator CC e CFC nos níveis baixo e médio, geram os menores valores da resposta.

#### 4.6.6 Demanda química de oxigênio

A matriz experimental e os resultados obtidos em termos de redução da DQO para cada condição experimental está disposto na Tabela 31.

Tabela 31 - Matriz ortogonal da resposta em termos de redução de DQO dos cultivos de microalgas em diferentes condições experimentais.

Condições Experimentais	Fatores				Redução de DQO (%)		Média	S/N
	CC	CFC	VA	FA				
1	1	1	1	1	6,80	6,56	6,679	16,49
2	1	2	2	2	17,68	17,22	17,452	24,83
3	1	3	3	3	19,28	19,00	19,137	25,64
4	2	1	2	3	16,11	17,05	16,576	24,38
5	2	2	3	1	9,70	8,92	9,310	19,36
6	2	3	1	2	21,47	21,20	21,333	26,58
7	3	1	3	2	3,27	3,82	3,547	10,92
8	3	2	1	3	28,53	28,93	28,729	29,17
9	3	3	2	1	12,19	12,87	12,533	21,95

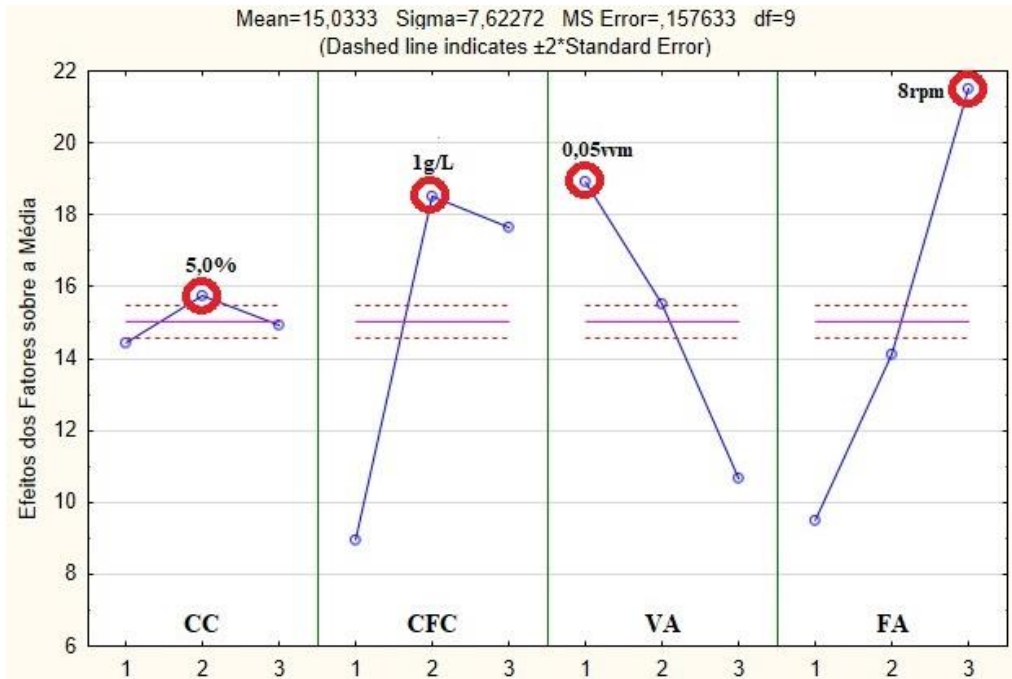
Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação.

Fonte: O autor.

A partir dos valores de resposta obtidos e dispostos na Tabela 31, foram calculados os efeitos dos fatores tanto em relação a média, quanto em relação a razão sinal-ruído, visando

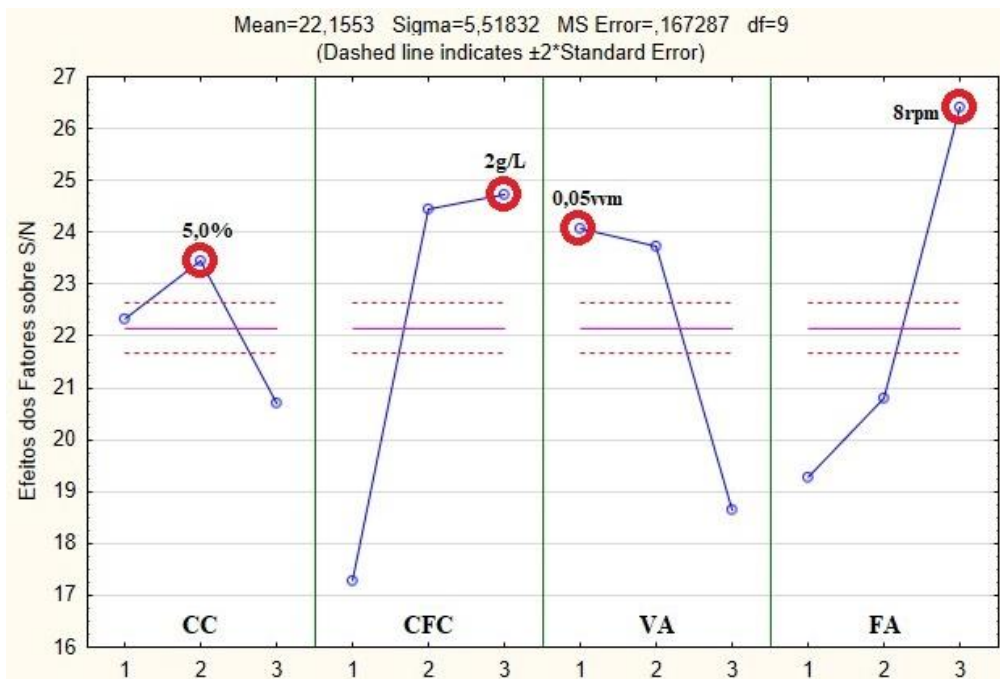
a maximização da redução de DQO (maior é melhor). Os gráficos das Figuras 44 e Figura 45 representam o resultado do melhor ajuste obtido de acordo com os valores dos efeitos calculados.

Figura 44 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de redução de DQO.



Fonte: O autor.

Figura 45 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de redução de DQO.



Fonte: O autor.

Analisando os resultados em relação a média, percebe-se que para maximizar a redução de DQO deve-se ajustar os fatores CC e CFC no nível 2 (5,0% e 1g.L<sup>-1</sup>), VA no nível 1 (0,05vvm) e FA no nível 3 (8rpm). Para a razão sinal-ruído, tem-se que o melhor ajuste é para CC ajustado no nível 2 (5,0%), CFC no nível 3 (2g.L<sup>-1</sup>), VA no nível 1 (0,05vvm) e FA no nível 3 (8rpm). Dando sequência a análise, foi feita a ANOVA, que está representada pela Tabela 32 para a média e pela Tabela 33 para a razão sinal-ruído.

Tabela 32 - ANOVA para a média em termos de redução de DQO.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	2,64	2	1,32	1,00
CFC	168,42	2	84,21	63,73
VA	103,13	2	51,56	39,03
FA	218,87	2	109,43	82,82
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	2,64	2	1,32	-

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

Tabela 33 - ANOVA para a razão sinal-ruído em termos de redução de DQO.

Fonte de Variação (Fatores)	SQ	gl	SMQ	F
CC	11,56	2	5,78	1,00
CFC	107,42	2	53,71	9,29
VA	55,58	2	27,79	4,81
FA	84,63	2	42,31	7,32
Erro	0	0	-	-
<b>Erro Ajustado</b>	11,56	2	5,78	1,00

Nota: CC=Concentração de Chorume; CFC=Concentração da Fonte de Carbono;VA=Vazão de Aeração e FA= Frequência de agitação; SQ=Soma dos Quadrados; gl=graus de liberdade;SMQ=Soma da Média dos Quadrados; F=Teste F.

Fonte: O autor.

A partir da análise da Tabela 32 da ANOVA para a média e para um valor de F crítico tabelado de 19, tem-se que os fatores FA e CFC e VA são significantes. Já ao analisar a Tabela 33 da ANOVA para a razão sinal-ruído e para o mesmo valor de F crítico, percebe-se que nenhum fator é significativo, enquanto que os fatores CFC, FA e VA são relevantes.

Deste modo, o fator mais impactante na resposta em termos de produtividade média de lipídeos dos cultivos de microalga *Chlorella minutissima* em reator *Raceway* para as condições do presente trabalho é o fator frequência de agitação, que deve ser ajustado no nível 3 (8rpm) para maximizar a resposta e diminuir a variabilidade. Os fatores CFC e VA, também, são significantes e devem ser ajustado de maneira a maximizar a resposta, no qual o CFC deve ser ajustado no nível 3 ( $2 \text{ g.L}^{-1}\text{g.L}^{-1}$ ) e VA no nível 1 (0,05vvm), o fator CC, pode ser ajustado da maneira que for mais conveniente, já que não tem impacto significativo no valor da resposta. Porém, vale ressaltar que a quantidade de chorume adicionada ao cultivo é determinante para a concentração de DQO inicial.

Assim, as condições de cultivo 3, 6 e 8 são as melhores condições, comprovadas pelos valores de obtenção de redução de DQO, com ajustes de VA no nível 3 e presença de fonte de carbono. Enquanto que as condições 1 e 7, com os ajustes do fator CFC no nível 1 e do fator VA nos níveis 1 e 2, geram os menores valores da resposta.

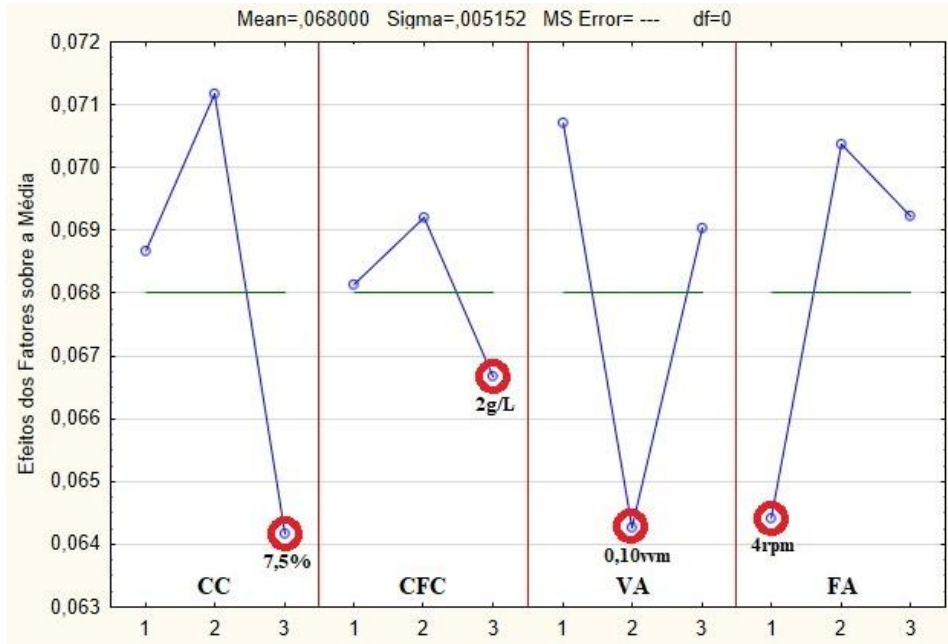
#### 4.6.7 Reologia

Os parâmetros reológicos considerados para a análise estatística, foram: o índice de consistência ( $k$ ), o índice de comportamento ( $n$ ) e a tensão limite de escoamento ( $\tau_0$ ), todos fatores presentes na equação do modelo matemático, que melhor se ajustou a reologia de suspensão microalgal, Herschel-Bulkley. Deste modo, pôde-se verificar a influência das diferentes condições experimentais nos parâmetros reológicos e propor o melhor ajuste para cada caso.

##### 4.6.7.1 Índice de consistência

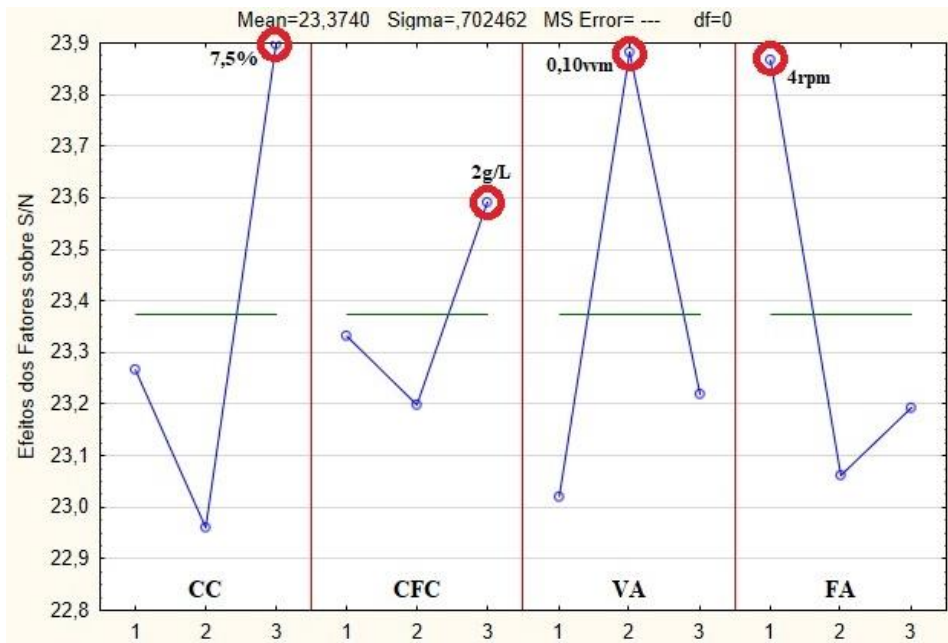
Como já mencionado, o índice de consistência ( $k$ ) demonstra quão resistente ao escoamento o fluido é. Deste modo, buscando diminuir a perda de carga, a análise deste parâmetro foi feita visando a minimização do valor de  $k$  (menor é melhor). Os gráficos de melhor ajuste estão representados na Figura 46 para a média e na Figura 47 para a razão sinal-ruído.

Figura 46 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de redução de índice de consistência.



Fonte: O autor.

Figura 47 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de redução de índice de consistência.



Fonte: O autor.

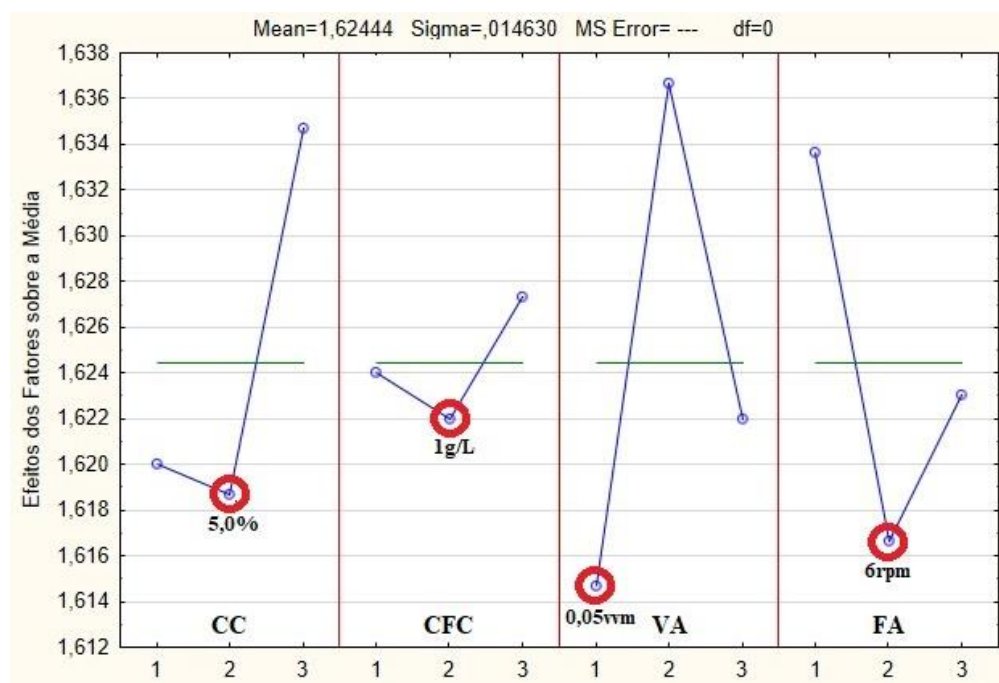


De acordo com a análise dos gráficos, o melhor ajuste dos fatores para a minimização da resposta índice de consistência é: CC no nível 3 (7,5%), CFC no nível 3 ( $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), VA no nível 2 ( $0,10\text{vvm}$ ) e FA no nível 1 (4rpm), tanto para a média quanto para a razão sinal-ruído. Fato este que é comprovado com a condição experimental 9, que fornece o menor valor da resposta, sendo de 0,0555. Também, pode-se observar no gráfico que o fator que mais impacta na resposta é o fator CC.

#### 4.6.7.2 Índice de comportamento (n)

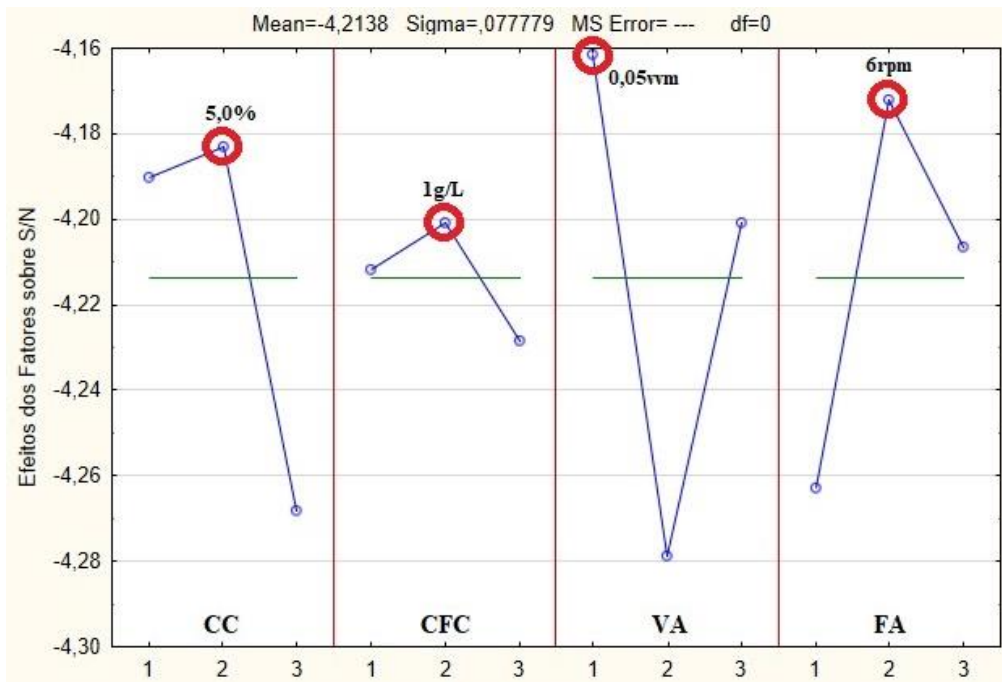
Para a análise estatística do índice de comportamento, buscou-se encontrar a condição no qual o valor da resposta mais se aproximasse de 1, pois quando  $n=1$  o modelo de Herschel-Bulkley é reduzido e o fluido é caracterizado como fluido newtoniano. Desta forma, a análise foi conduzida de forma a minimizar a resposta (menor é melhor). Os gráficos de melhor ajuste estão representados na Figura 48 para a média e na Figura 49 para a razão sinal-ruído.

Figura 48 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de índice de comportamento.



Fonte: O autor.

Figura 49 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de índice de comportamento.



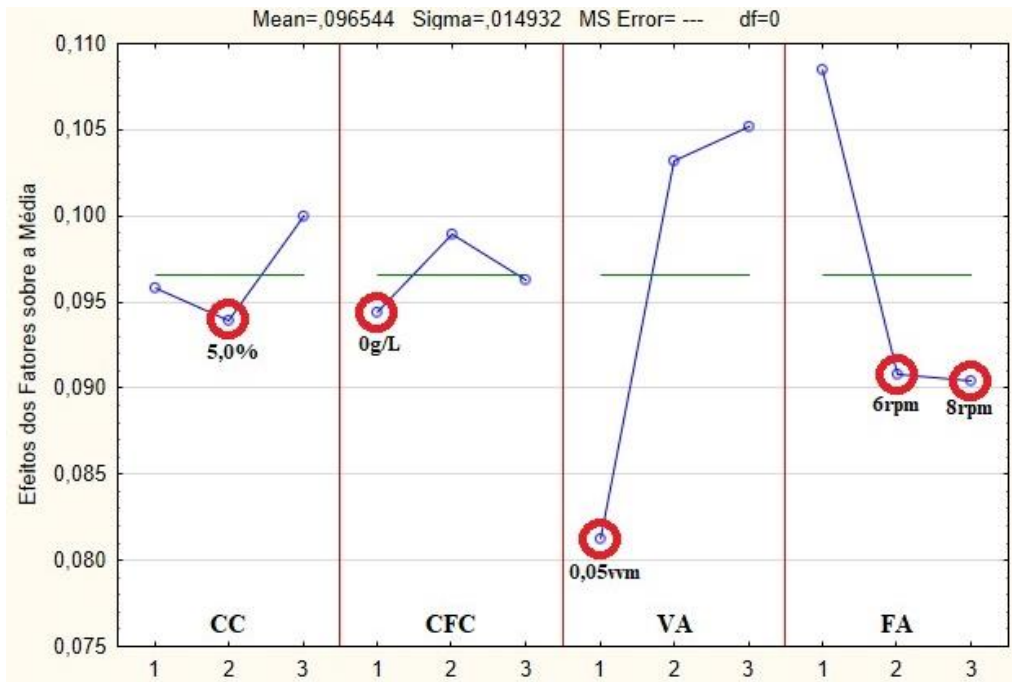
Fonte: O autor.

De acordo com a análise dos gráficos, o melhor ajuste dos fatores para a minimização da resposta índice de comportamento é: CC no nível 2 (5,0%), CFC no nível 2 ( $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), VA no nível 1 (0,05vvm) e FA no nível 2 (6rpm), tanto para a média quanto para a razão sinal-ruído. Nenhuma condição experimental da matriz atende esse ajuste, porém a condição 6 com CC ajustado no nível 2, VA no nível 1 e FA no nível 2, apresenta o menor valor da resposta, sendo de 1,604. Também, pode-se observar no gráfico que o fator que mais impacta na resposta é o fator VA.

#### 4.6.7.3 Tensão limite de escoamento

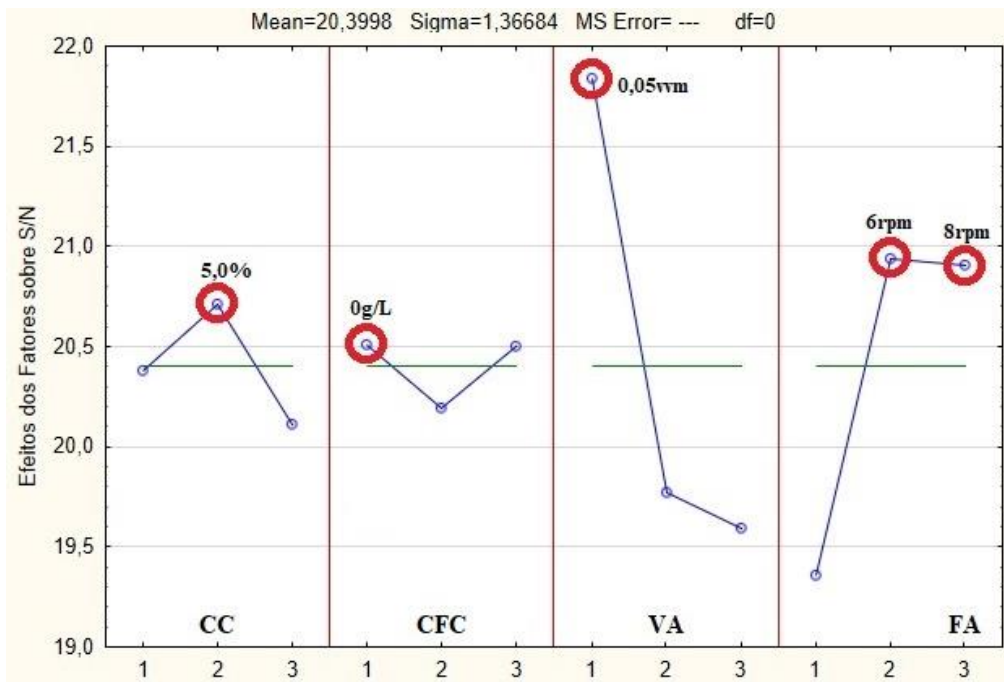
Analogamente a análise estatística do índice de comportamento, o objetivo foi minimizar a resposta (menor é melhor), em termos de tensão limite de escoamento, para que, deste modo, o modelo de Herschel-Bulkley fosse reduzido e o fluido é caracterizado como fluido newtoniano. Para tal, buscou-se encontrar a condição no qual o valor da resposta mais se aproximasse de 0. Os gráficos de melhor ajuste estão representados na Figura 50 para a média e na Figura 51 para a razão sinal-ruído.

Figura 50 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média em termos de tensão limite de escoamento.



Fonte: O autor.

Figura 51 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão sinal-ruído em termos de tensão limite de escoamento.



Fonte: O autor.

De acordo com a análise dos gráficos, o melhor ajuste dos fatores para a minimização da resposta tensão limite de escoamento é: CC no nível 2 (5,0%), CFC no nível 1 ( $0\text{g.L}^{-1}$ ), VA no nível 1 (0,05vvm) e FA no nível 2 (6rpm) ou 3 (8rpm), tanto para a média quanto para a razão sinal-ruído. Nenhuma condição experimental da matriz atende esse ajuste, porém a condição 6 com CC ajustado no nível 2, VA no nível 1 e FA no nível 2, apresenta o menor valor da resposta, sendo de 0,726. Também, pode-se observar no gráfico que o fator que mais impacta na resposta é o fator VA.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados:

- a concentração da fonte de fonte de carbono (acetato) adicionada ao cultivo, é o fator que influencia na maior quantidade das respostas analisadas para o cultivo da microalga *Chlorella minutissima*, nas condições apresentadas, sendo elas: crescimento celular dos cultivos, biomassa total obtida, produtividade de biomassa e produtividade média de lipídeos, no qual é o fator mais significativo, teor de lipídeos e demanda química de oxigênio;
- o chorume apesar de conter metais pesados e apresentar uma certa toxicidade, colabora muito com o crescimento do cultivo microalgal, nas condições com com CFC ajustado em nível 3. Porém, quando há alta concentração de chorume e baixa concentração de acetato, o cultivo é prejudicado;
- apesar da VA não ter demonstrado significância para a maioria das resposta, é o fator que mais impacta em termos de parâmetros reológicos, visando o comportamento de fluido newtoniano.
- Os cultivos com concentração acima de  $0,25\text{g,L}^{-1}$ , foram os que tiveram maiores taxas de redução de DQO;
- exceto para a DQO, a frequência de agitação é não-significante para todas as outras respostas. Além disso, altas velocidades de agitação do cultivo demonstrou causar tensão de cisalhamento nas partículas;
- em termos de reologia, pôde ser observado comportamento de fluido dilatante para a suspensão de microalgas, em todas as condições de cultivo;

**REFERÊNCIAS**

- ABEDINI NAJAFABADI, H.; MALEKZADEH, M.; JALILIAN, F.; VOSSOUGH, M.; PAZUKI, G. Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 311–317, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.076>. Acesso em: 28 abr 2019.
- ADESANYA, A.; DAMIEN, C.; MALCOLM, R. The rheological characterization of algae suspensions for the production of biofuels. **Journal of Rheology**, v. 56, n. 4, p. 925-939, 2012.
- AL HATTAB, M.; GHALY, A.; PÉREZ DE LOS RÍOS, A. Production of Biodiesel from Marine and Freshwater Microalgae: A Review. **Advances in Research Italy**, v. 3, n. 24, p. 107–115, 2015.
- AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 1834-1840, 2009.
- ANTONIO, P.R. **Avaliação do efeito do CO<sub>2</sub> na produção lipídica de *Chlorella vulgaris* visando à produção de biodiesel**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- ARANDA, M. H.; JUNG, C. F.; CATEN, C. S. T. Aplicação do Projeto de Experimentos para Otimização de uma Inovação Tecnológica. **Revista Gestão Industrial**, v. 4, p. 116-132, 2008.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 2012. 188 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BABEL, S.; TAKIZAWA, S.; OZAKI, H. Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1193-1202, 2002.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. New York: Elsevier Science Publishers, 1989. 189p
- BARRADO, E.; VEGA, M.; GRANDE, P.; DEL VALLE, J.L. Optimization of a purification method for metal-containing wastewater by use of a Taguchi experimental design. **Water Research**, v. 30, p. 2309–2314, 1996.

- BEARDALL, J.; YOUNG, E.; ROBERTS, S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. **Aquatic Sciences**, v. 63, p. 44-69, 2001.
- BECKER, E.W. In: BADDILEY *et al.* (eds). **Microalgae: biotechnology and microbiology**, Cambridge University Press, 1994. 293p.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. RICHMOND, A. (eds). London: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science**, 2004. 566p.
- BECKER, E. W. Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2013. v. 2, p. 671-691.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia de indivíduos a ecossistemas**. Porto Alegre: Artmed Editora S/A, 2007.
- BENNEMANN, J.; OSWALD, W.J. **Systems and Economic Analysis of Microalgal Ponds for Conversion of CO<sub>2</sub> to Biomass**. Department of Energy, p. 201, 1996.
- BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K.C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, 2011.
- BIDONE, R. F. **Tratamento de lixiviado de aterro sanitário por um sistema composto por filtros anaeróbios seguidos de banhados contruídos: estudo de caso**: Central de Resíduos do Recreio, em Minas do Leão/RS. 2007. 168 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification, Canadian Journal of Biochem. **Physiol**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Biotechnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: **Editora Edgar Blücher**, 2001.
- BOURGOYNE Jr, A. T.; MILLHEIM, K. K.; CHENEVERT, M. E.; YOUNG Jr, F. S. **Applied Drilling Engineering**. Texas: SPE Textbook Series, 1991. v. 2, 502 p.
- BOURNE, M. C. Food texture and viscosity: concept and measurement. New York: **Academic Press**, 1982.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90-98, 2017.

- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.
- BRITO, R. A. **Ozonização catalítica do chorume proveniente do aterro sanitário de Cachoeira Paulista - SP na presença de ferro em sistema contínuo**. 2014. 219 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. Como Fazer Experimentos. 4. ed. Porto Alegre: **Editora Artmed**, 2010. 401 p.
- BUTTON, S. T. **Metodologia para Planejamento Experimental e Análise de Resultados**. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 88 p.
- CASTRO, A. G.; COVAS, J. A.; DIOGO, A. C. **Reologia e suas Aplicações Industriais**. Lisboa: Ed. Instituto Piaget, 2001. 462 p.
- CHEAH, W.Y.; LING, T.C.; SHOW, P.L.; JUAN, J.C.; CHANG, J.S.; 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.
- CHIANG, Y. M.; HSIEH, H.H. The use of the Taguchi method with grey relational analysis to optimize the thin-film sputtering process with multiple quality characteristic in color filter manufacturing. **Computers & Industrial Engineering**, v. 56, p. 648-661, 2009.
- CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, W.H.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3097-3105, 2010.
- CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHISTI, Y. Raceways-based production of algal crude oil. **Green: a systemic approach to energy**. v. 2, n. 5-6, p. 209-261, 2012.
- CHIU, S.; KAO, C.; CHEN, T.; CHANG, Y.; KUO, C.; LIN, C. *Bioresource Technology* Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as



- nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179-189, 2015.
- DE GODOS, I., H. O.; GUZMAN, R.; SOTO, P. A.; GARCIA-ENCINA, E.; BECARES, R. MUNOZ; VARGAS V. A. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.102, p. 923-927, 2011.
- DEMIRBRAS, A.; DEMIRBRAS, M. F. Importance of algae as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 163-170, 2011.
- DEMIRBAS, M. F.; BALAT, M.; BALAT, H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 7, p. 1746-1760, 2009.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLEIA, M.; CARVALHO S, M.; FEET R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- EPPLEY, R.W. The Growth and Culture of Diatoms. In: WERNER, D. **The biology of diatoms**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1977. v.13, p. 24-65.
- FRANCESCHINI, G.; MACCHIETTO, S. Validation of a model for biodiesel production through model-based experiment design. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 2007.
- FRANCO, C. Algas: promessa viável. **Revista Biodieselbr**, n. 25, 2011.
- GLADUE, R. M. Heterotrophic microalgae production: potential for application to aquaculture feeds. In: FULKS, W.; MAIN, K. (eds.). **Rotifer and Microalgae Culture Systems**. US-ASIA Workshop, 1991, Honolulu. Proceedings. Honolulu, p. 275-286, 1991.
- GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, Jan, p. 259-270, 2017.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Algae. **The Quarterly Review of Biology**, v. 77, n. 1, p. 70-71, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/343625>. Acesso em: 02 out. 2018.
- GROBBELAAR, J.U. Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. **Blackwell Science**. 2004.
- GUDIN, C.; THERPENIER, C. Bioconversion of solar energy. **Advances in Biotechnological**, v. 6, p. 73-110, 1986.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L., CHANLEY, M. H. (eds.). **Culture of marine invertebrate animals**. New York: **Plenum**, 1975.

GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAMANNA, L.; RAMSUNDAR, P.; SINGH, P.; RAWAT, I.; BUX, F. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 299-315, 2017.

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

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**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 225-231, 2009 .

HARIDY, S.; GOUDA, S. A.; WU, Z. An integrated framework of statistical process control and design of experiments for optimizing wire electrochemical turning 85 process. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v.53, p. 191-207, 2011.

HATTAB, M.; GHALY, A. Production of Biodiesel from Marine and Freshwater Microalgae: A Review. **Advances in Research**, v. 3, n. 2, p. 107–155, 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.

HELLENBUST, J. A. Lighth: plants. In: KINNE, O. (ed.). *Marine Ecology. A Comprehensive, Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters*. London: **Wiley Interscience**, 1970. p. 124-158.

HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; RUAN, R.; HU, B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245-2253, 2011.

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

HOU, Y.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; CHEN, S.; ZHENG, Y.; CHEN, F. CAH1 and CAH2 as key enzymes required for high bicarbonate tolerance of a novel microalga *Dunaliella salina* HTBS. **Enzyme and microbial technology**, v. 87-88, p. 17-23, 2016.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, GU. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.

HUNTLEY, M. E.; REDALJE, D. G. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic

- microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 12, p. 573-608, 2007.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.
- JEON, H.; JEONG, J.; BAEK, K.; MCKIE-KRISBERG, Z.; POLLE, J. E. W.; JIN, E. S. Identification of the carbonic anhydrases from the unicellular green alga *Dunaliella salina* strain CCAP 19/18. **Algal Research**, v. 19, p. 12-20, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.010>. Acesso em: 02 out. 2018.
- JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E.A.; EMBIRUCU, M.; GHIRARDI, M.L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1406-1413, 2010.
- JOSEPH, V.; JOSEPH, A. Algae in the Assessment of Industrial Wastewater Holding Ponds. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 132, p. 251-261, 2001.
- KAEWPIINTONG, 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.
- KANNAN, D. C.; PATTARKINE, V. M. Algal Biorefineries. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (eds.). *Algal Biorefineries*. New York: **Springer**, 2014. p. 296-310.
- KHALILI M.; POUR, A. A. P.; NAGHAVI, M. R.; MOHAMMAD, A. E. Evaluation of drought tolerance in safflower genotypes based on drought tolerance indices. **Notulae Botanicae Hoeti Agrobotanica Cluj-Napoca**, v. 4, n. 11, p. 78-85, 2014.
- 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.
- KIM, G. Y.; HEO, J.; KIM, H. S.; HAN, J. I. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 72–77, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.009>. Acesso em: 02 out. 2018.
- KIM, S. G.; CHOI, A.; AHN, C. Y.; PARK, C. S.; PARK, Y. H.; OH, H. M. Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 190–194, 2005.
- KISHORE, R.A., TIWARI, R., DVIVEDI, A.; SINGH, I. Taguchi analysis of the residual tensile strength after drilling in glass fiber reinforced epoxy composites. **Materials and Design**, v. 30, p. 2186-2190, 2009.

- KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYA, T. W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, p. 971-975, 2003.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters: **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.
- KOLLER, M. Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. In: PROKOP, A.; BAJPAI, R. K.; ZAPPI, M. E. (Ed.). **Algal Biorefineries: Products and Refinery Design**. Cham: Springer International Publishing, v. 2, p. 133-186, 2015.
- LANDAZÁBAL, L; SOLANO, A.; FERREIRA, C.; KAFAROV, V. Improvement of lipid productivity on *Chlorella vulgaris* using waste glycerol and sodium acetate. **Journal Ciencia Tecnología y Futuro**, v. 5, n. 2, p. 113-126, 2013.
- LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 88, p. 988-996, 2010.
- LEKANG, O. I. Aquaculture engineering. **Blackwell Pub**, Oxford, v. 1, p. 37, 2007. DOI:10.1002/9780470995945.
- 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, C.; YU, Y.; ZHANG, D.; LIU, J.; REN, N.; FENG, Y. Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 680-684, 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4623>. Acesso em: 02 out. 2018.
- 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.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas. São Carlos: **RiMa**, 2006.
- LOURENÇO, S. O.; MARQUES Jr, A. N. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2002. p. 195-227.
- MACHADO, J. C. V. **Reologia e Escoamento de Fluidos: ênfase na indústria do petróleo**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2002.
- MAGRO, F. G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. M. Bioethanol production using microalgae: a review. **Semina**, 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.
- MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C.; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MARTÍN, M.; GROSSMANN, I. E. On the synthesis of sustainable biorefineries. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 3044-3064, 2012.
- 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.* **Renewable Energy**, v. 81, p. 523-533, 2015.
- MELO, R. R.; MENEZZI, C. H. S. Comportamento reológico da madeira e derivados. **Ciência da Madeira**, v. 1, n. 1, p. 25-40, 2010.
- MITRA, D.; VANLEEUEEN, J.; LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, p. 40-48, 2012.
- MOHAN, N.; RAO, P. H.; KUMAR, R. R.; SIVASANKARAN, S.; SIVASUBRAMANIAN, V. Studies on mass cultivation of *Chlorella vulgaris* and effective harvesting of biomass by low-cost methods. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 01, p. 29-39, 2009.
- MONTEIRO, S. R; MOTA, J. A. C. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. São Paulo: **Quím. Nova**, v. 36, n. 10, 2013.
- MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos.** In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOENERGIA, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA E ENERGIAS RENOVÁVEIS, 1., 2010, Curitiba.
- MORAIS, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**. v. 7, p. 117-123, 2015.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 1997. 264p.

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

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

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Production of biomass and carbon, hydrogen, nitrogen and protein contents in microalgae. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1760-1767, 2009. ISSN 0103-8478.

OLIVEIRA, C. O. **Análise das propriedades reológicas de materiais cimentícios associando o conceito de empacotamento de partículas**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Ilha Solteira, 2013.

PELEGRINE, D. H. G.; SILVA, F. C.; GASPARETTO, C. A. Rheological behavior of pineapple and mango pulps. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v. 35, n. 8, p. 645-648, 2002.

PELEGRINE, D. H. G.; SILVA, M. B.; LOURES, C. C. *Chlorella sp* microalgae suspensions - rheological behaviour analyzes at different culture times. **J Fundam Renewable Energy Appl**, v. 5, n. 5, p. 123, 2015. DOI: 10.4172/2090-4541.S1.003

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

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.026>. Acesso em: 02 out. 2018.

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

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. D.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.035.

- POHNDORF, R. S.; CAMARA, A. S.; LARROSA, A. P. Q.; PINHEIRO, C. P.; STRIEDER, M. M.; PINTO, L. A. A. Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 25-32, 2016.
- PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 159-171, 2013.
- PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 287-293, 2001.
- 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.
- RAMOS, L.; KUCEK, K.; DOMINGOS, A.; WILHELM, H. Biodiesel - um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003. Disponível em: <http://www.resol.com.br/textos/Biodiesel.pdf>. Acesso em: 02 out. 2018.
- RANA, R. S.; PUROHIT, R.; SHARMA, A. K.; RANA, S. Optimization of Wear Performance Composites Using Taguchi Method. **Procedia Materials Science**, v. 6, p. 503-511, 2014.
- RAO, M. A.; RIZVI, S. S. Thermodynamic properties of food in dehydration. **Engineering properties of foods**, New York: Marcel Dekker, 1986. p. 133-214.
- RAO, M. A.; ANANTHESWARAN, R. C. Rheology of fluids in food processing. **Food Technology**, v.36, p.116-126, 1982.
- RASDI, N. W.; QIN, J. G. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 2221-2230, 2015.
- RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University, 1988. p. 331-356.
- RAMSUNDAR, P.; GULDHE, A.; SINGH, P.; BUX, F. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella*

- sorokiniana* under different modes of cultivation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 82-92, 2017.
- RAZAAK, S. A.; ALI, S. A. M.; HOSSAIN, M. M.; DELASA, H. Biological CO<sub>2</sub> fixation with production of microalgae in wastewater - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.76, p. 379-390, 2017.
- REIS, A.; GOUVEIA, L. Biorrefinarias de microalgas. **Boletim de Biotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 28-29, 2013.
- REYIMU, Z.; OZÇIMEN, D. Batch cultivation of marine microalgae *Nanochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 40-46, 2017.
- 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.
- RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture. [s.l.] **Blackwell Science**, 2004.
- SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 667-676, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.052>. Acesso em: 02 out. 2018.
- SCHMITZ, R., MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.
- SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGUG, J. H;
- SCHRAMM, G. Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos. 2. ed., São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2006.
- SELVAKUMAR, P.; UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180-185, 2014.
- SHARMA, S. K.; MULVANEY, S. J.; RIZVI, S. S. H. Food processing engineering: theory and laboratory experiments. New York: **Wiley-Interscience**, 1999. 368 p. ISBN: 978-0-471-32241-2.
- SHUBERT, L.E. Nonmotile coccoid and colonial green algae. In: WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. (eds.). Freshwater algae of North America: ecology and classification. San Diego: **Academic Press**, 2003. p. 253-309.



- SILVA, F.; PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. Reologia do suco de acerola: efeitos da concentração e da temperatura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.1, p. 121-126, 2005.
- SILVA H. A.; SILVA M. B. Aplicação de um projeto de experimentos (DOE) na soldagem de tubos de zircaloy-4. São Paulo: **Produção & Engenharia**, v.1, p. 41-52, 2008.
- SILVA, L. T.; GOUVEIA, L.; REIS, A. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 1043-1053, 2014.
- SINGH, A.; OLSEN S. I. Critical analysis of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Appl Energy**, v. 88, p. 3548-3555, 2011.
- SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy Sustainable Development**, v. 31, n. 31, p. 605-629, 2011.
- SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. Introduction to Food Engineering. 3. ed. **Academic Press**, 2003. 656 p.
- SINGH, V.; TIWARI, A.; DAS, M. Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae: a review. **Fuel**, v.173, p. 90-97, 2016.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PELICIONE, L. C.; OLIVERA, A. Use of organic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. **Brazilian Journal of Biology**, v. 01, p. 10-15, 1999.
- SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the Bligh n' Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 681-688, 1996.
- SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas).Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- SOUTO, G. D. D. B. **Lixiviado de aterros sanitários brasileiros - estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar ("stripping")**. 2009. 371 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- SOUZA, H. J. C.; MOYSES, C. B.; PONTES, F. J.; DUARTE, R. N.; SILVA, C. E. S.; ALBERTO, F. L.; FERREIRA, U. R.; SILVA, M. B. Optimization Molecular assay optimized by Taguchi experimental design method for venous thromboembolism investigation. **Molecular and Cellular Probes**, v. 25, n. 1, p. 231-237, 2011.
- SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable &**

**Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 16, p. 4316-4342, 2012.

SUNG, M. G.; LEE, B.; KIM, C. W.; NAM, K.; CHANG, Y. K. Enhancement of lipid productivity by adopting multi-stage continuous cultivation strategy in *Nannochloropsis gaditana*. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 20–25, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.100>. Acesso em: 02 out. 2018.

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

TAGUCHI, G. **Introduction to Quality Engineering: Designing Quality into Products and Processes**. Quality Resources: Asian Productivity Organization, Tokyo. 191p.

TAGUCHI, G.; CHOWDHURY, S.; YUIN, W. Introduction to Orthogonal Arrays. In: TAGUCHI, S.; YANO, H. (eds.). **Taguchi's Quality Engineering Handbook**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. p. 584-596.

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

TANGO, M. D. **Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas**. 2002. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

TANNER, R. I. **Engineering Rheology**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2000.

TANSEL, I.N.; GULMEZ, S.; DEMETGUL, M.; AYKUT, S. Taguchi Method - GONNS integration: Complete procedure covering from experimental design to complex optimization. **Expert Systems with Applications**, v. 38, p. 4780-4789, 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. **Catcom**, v. 84, p. 44-47, 2016.

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.

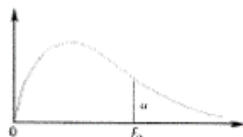
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Test Methods for evaluating solid waste. Physical Chemical Methods.** Method 3005A – Acid Digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis By FLAA or ICP spectroscopy. 1999.
- VERMA, N. M.; MEHROTRA, S.; SHUKLA, A.; MISHRA, B. N. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 10, p 1402-1411, 2010.
- VIDAL, J. R. M. B.; GASPARETTO, C. A.; GRANDIN, A. Efeito da temperatura no comportamento reológico da polpa de manga. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.1, n.2, p.69-76, 2000.
- VONSHAK, A. Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry. In: \_\_\_\_\_, (eds). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. London: **Taylor and Francis**, 1997. p. 43-66.
- WAN, C.; ALAM, M. A.; ZHAO, X. Q.; ZHANG, X. Y.; GUO, S. L.; HO, S. H.; CHANG, J. S.; BAI, F. W. Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 251-257, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>. Acesso em: 02 out. 2018.
- 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, n. 4 , p. 1174-1186, 2010.
- WANG, S.; HUANG, G. H. A multi-level Taguchi-factorial two-stage stochastic programming approach for characterization of parameter uncertainties and their interactions: An application to water resources management. **European Journal of Operational Research**, v. 240, p. 572-581, 2015.
- WANG, T. Y.; HUANG, C.Y. Improving forecasting performance by employing the Taguchi method. **European Journal of Operational Research**, v. 176, n. 2, p. 1052-1065, 2007.
- WEISSMAN, J. C; TILLET, D. M.; GOEBEL, R. P. **Design and operation of an outdoor microalgae test facility**. Report SERI/STR-232-3569. Colorado: Solar Energy Research Institute, 1989.
- 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.
- WOODWORTH, B. D.; MEAD, R. L.; NICHOLS, C. N.; KOLLING, D. R. J. Photosynthetic light reactions increase total lipid accumulation in carbon-supplemented

- batch cultures of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, v. 179, p. 159-164, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.098>. Acesso em: 02 out. 2018.
- XIA, C.; ZHANG, J.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. ***Biotechnology for Biofuels***, v. 4, p. 4-15, 2011.
- YANG, H.J.; HWANG, P.J.; LEE, S.H. A study on shrinkage compensation of the SLS process by using the Taguchi method. ***International Journal of Machine Tools & Manufacture***, v. 42, p. 1203-1212, 2002.
- YANG J.; RASA, E.; TANTAYOTAI, P.; SCOW K.M.; YUAN, H.; HRISTOVA, K.R. Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. ***Bioresource Technology***, v. 102, p. 3077-3082, 2011.
- YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P. W-3 fatty acids: alternative sources of production. Waterloo: ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 57, n. 2, p. 419-425, 1991.
- ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; PURUHITO, E.; CHEN, Y. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. ***Bioresource Technology***, v. 101, p. 5297-5304.,2010.
- ZHAO, B.; ZHANG, Y.; CUI, G. Carbon dioxide fixation and biomass production from combustion flue gas using energy microalgae. ***Energy***, v. 89, p. 347-357, 2015.
- ZHU, L.; HILTUNEN, E.; SHU, Q.; ZHOU, W.; LI, Z.; WANG, Z. Biodiesel production from algae cultivated in winter with artificial wastewater through pH regulation by acetic acid. ***Applied Energy***, v. 128, p. 103-110, 2014.
- 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 minutissima* via solventes. ***Holos***, v. 2, p. 66, 2017.

## ANEXOS

### ANEXO A - Valores tabelados de $F_{\text{crítico}}$ para teste bilateral com $\alpha=0,05$ .

Critical Values of the F Distribution for  $\alpha = 0.05$



Denominator Degrees of Freedom ( $k_2$ )	Numerador Degrees of Freedom ( $k_1$ )																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$	
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3	
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50	
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67	
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23	
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93	
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01	1.96	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73	
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71	
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69	
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67	
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65	
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25	
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00	

**ANEXO B - Caracterização do chorume proveniente do aterro sanitário do município de Cachoeira Paulista.**

Parâmetros	Resultados		Legislação <sup>2</sup>
	Chorume <i>in natura</i> coletado em agosto/2010 <sup>1</sup>	Chorume <i>in natura</i> coletado em julho/2012	
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg.L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	4345,88	3565,0	-
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO <sub>5</sub> ) (mg.L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	409,70	352,3	60
Razão DBO <sub>5</sub> /DQO	0,094	0,099	-
Carbono Orgânico Total (COT) (mg.L <sup>-1</sup> )	618,1	1233,3	-
Sólidos Totais (mg.L <sup>-1</sup> )	6035,2	11700,0	-
Sólidos Totais Fixos (mg.L <sup>-1</sup> )	1032,0	9180,0	-
Sólidos Totais Voláteis (mg.L <sup>-1</sup> )	5003,2	2520,0	-
pH	8,78	8,60	5,0 a 9,0
Óleos e Graxas (mg.L <sup>-1</sup> )	172,9	184,3	20
Ferro Total (mg.L <sup>-1</sup> )	4,3 mg.L <sup>-1</sup>	15,535	15,0
Turbidez (NTU)	630,0	610	40
Cor (Pt-Co / mg.L <sup>-1</sup> )	1763,2	1493,58	100,0
Nitrogênio Amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	1582,3	1452,0	20,0
Nitrogênio Orgânico (mg.L <sup>-1</sup> )	860,0	610,9	-
Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )	0,3	8,0	-
Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	2,1	1,8	-
Nitrogênio Total (mg.L <sup>-1</sup> )	2444,7	2072,7	-
Fósforo Total (mg.L <sup>-1</sup> )	2,1	15,17	-
Arsênio (mg.L <sup>-1</sup> )	0,016	0,018	0,2
Cromo Total (mg.L <sup>-1</sup> )	0,256	0,49	5,0
Manganês (mg.L <sup>-1</sup> )	0,037	0,223	1,0
Níquel (mg.L <sup>-1</sup> )	0,073	0,18	2,0
Zinco (mg Zn/ L)	0,089	0,13	5,0

Fonte: Brito, (2014).

**ANEXO C - Comparação entre os valores de obtenção de biomassa e lipídeos cultivado em diferentes concentrações de nitrato de sódio e acetato de sódio.**

Carbon/Nitrogen Ratio	Biomass Produced (g/L)	Lipid (%)	Nitrogen Consumed (% $\text{NO}_3\text{-N}$ )	Phosphorus Consumed (% $\text{PO}_4\text{-P}$ )
2.94 mM Nitrate (Control)	1.75	4	49	13
20 mM Acetate 2.94 mM Nitrate	3.4	2	90	25
10 mM Acetate 2.94 mM Nitrate	2.66	2	96	18
5 mM Acetate 2.94 mM Nitrate	1.96	1	64	8
20 mM Acetate 1.47 mM Nitrate	3.02	1	59	21
10 mM Acetate 1.47 mM Nitrate	2.44	9	81	35
5 mM Acetate 1.47 mM Nitrate	1.69	1	61	20
20 mM Acetate 1.02 mM Nitrate	2.52	7	25	23
10 mM Acetate 1.02 mM Nitrate	1.97	2	69	18
5 mM Acetate 1.02 mM Nitrate	1.42	3	61	15

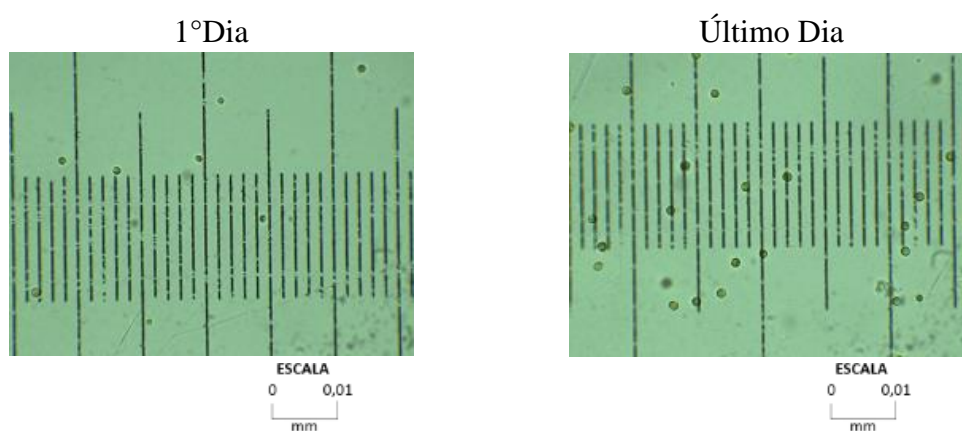
Fonte: Landazábal, (2013).

## APÊNDICES

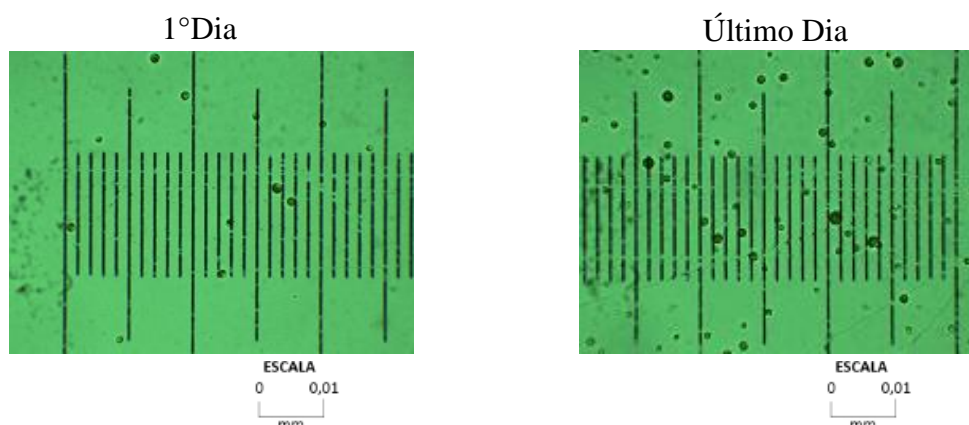
### APÊNDICE A - Caracterização metálica do chorume utilizado nos cultivos.

Chorume como meio do Cultivo	Resultados em mg.L <sup>-1</sup>												
	Al	P	Si	Se	Cr	Mg	Na	K	Zn	Ti	Fe	Ca	Sn
C1	0,16	13,16	2,30	0,14	0,88	51,20	4263,50	2074,25	0,35	0,00	5,95	31,78	0,32
C2	0,40	12,85	0,30	0,14	0,90	49,85	3881,00	2074,50	0,51	0,00	7,48	28,98	0,26
C3	0,00	12,62	0,00	0,07	0,00	55,55	2958,50	1216,50	0,00	0,00	3,57	9,08	0,05
C4	0,19	8,77	0,00	0,09	0,21	48,48	3233,50	2029,50	0,94	0,00	5,96	30,55	1,14
C5	0,00	13,59	0,00	0,07	0,00	69,70	2263,50	1088,25	0,14	0,00	4,13	9,22	0,00
C6	0,63	7,48	2,34	0,10	0,22	47,06	3316,00	2095,00	1,14	0,00	7,94	27,34	1,14
C7	0,38	11,65	1,64	0,14	0,96	50,95	4561,00	2309,25	0,70	0,00	7,27	35,61	0,38
C8	0,68	13,55	1,81	0,13	0,98	53,85	4303,50	2097,75	0,25	0,00	8,49	28,88	0,20
C9	0,00	9,81	0,00	0,14	0,83	48,59	4203,50	2101,00	0,42	0,00	6,36	30,33	0,43
<b>CHORUME NATURA</b>	4,53	14,13	3,27	0,17	2,30	56,86	4005,50	2084,50	1,20	0,80	6,16	36,76	1,14

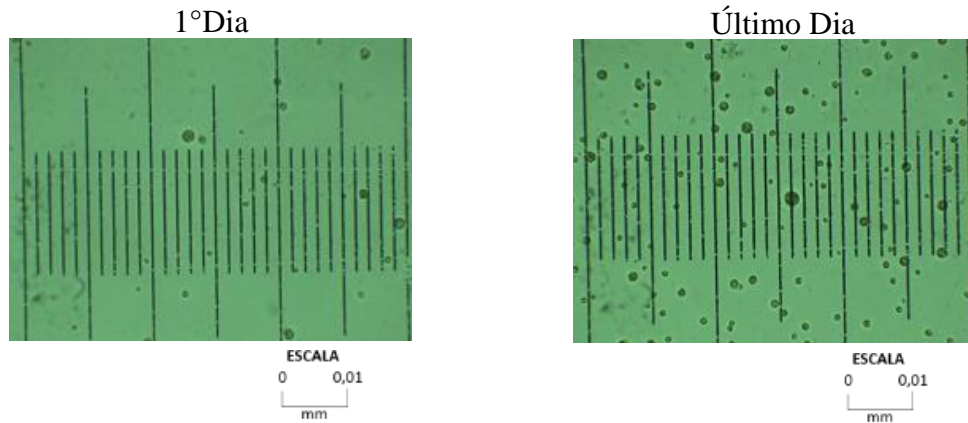
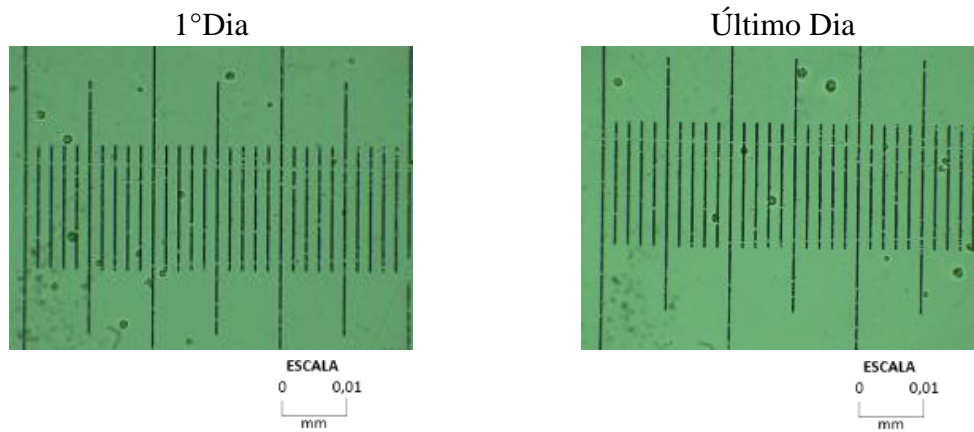
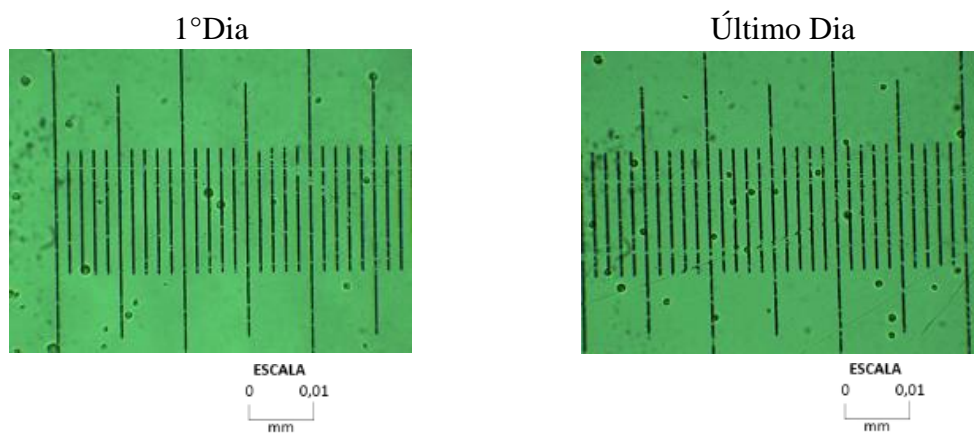
### APÊNDICE B - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 1.

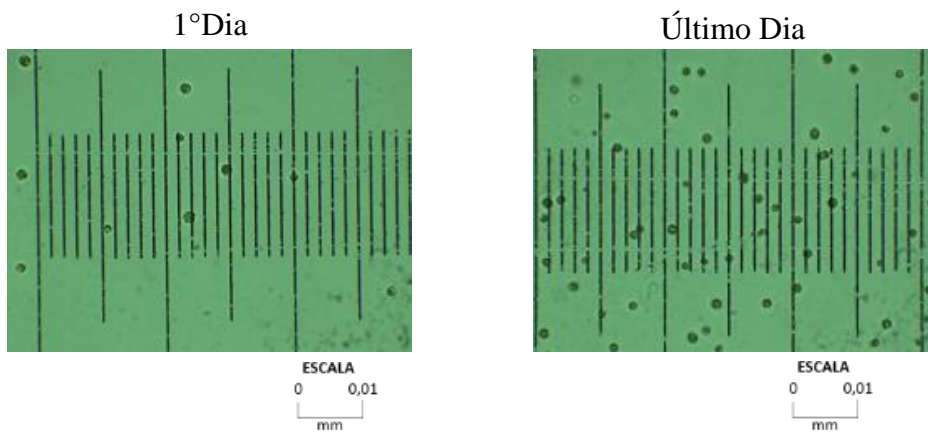
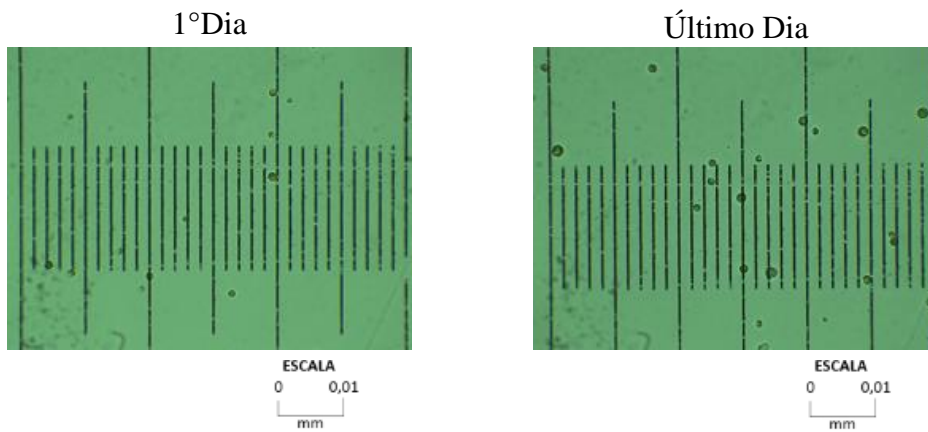
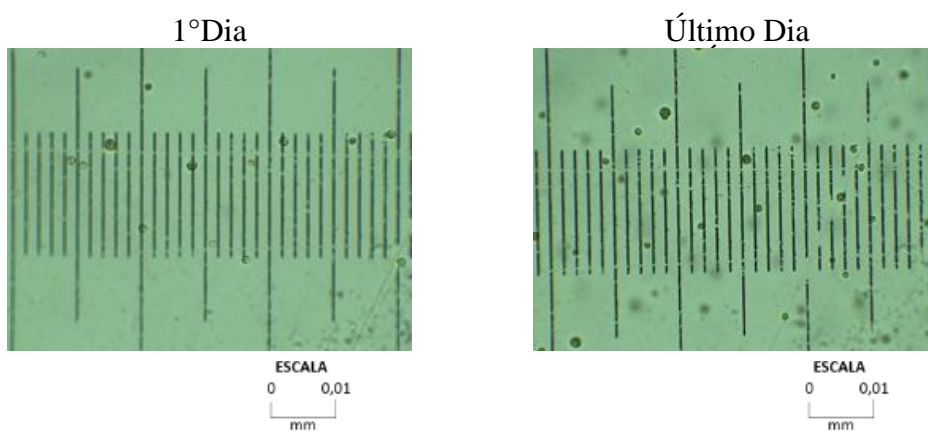


### APÊNDICE C - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 2.



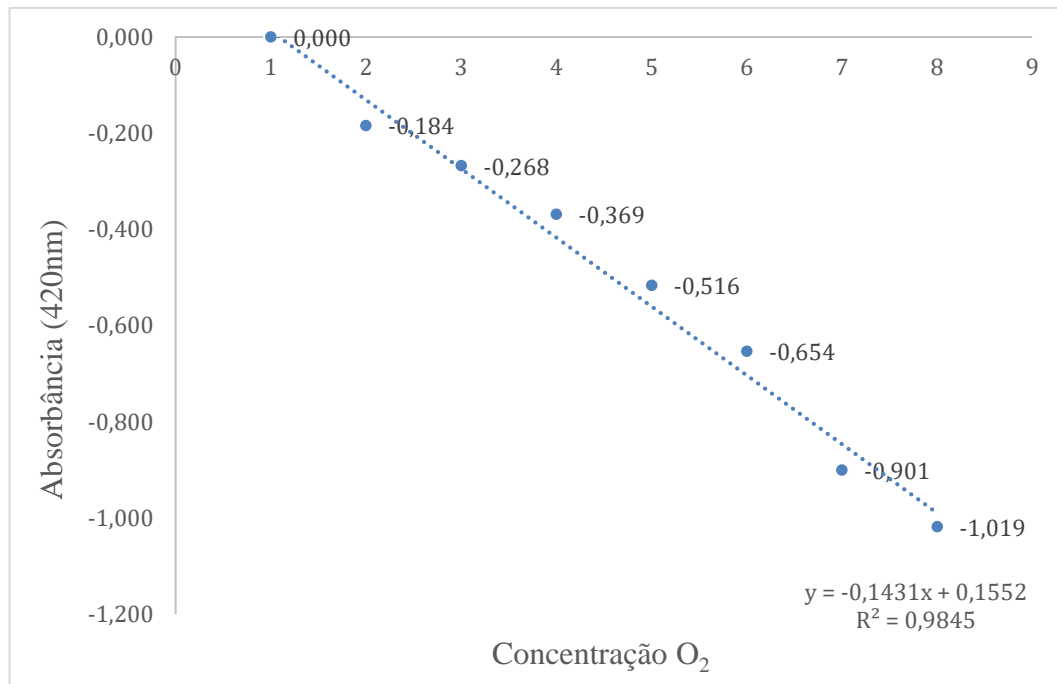


**APÊNDICE D - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 3.****APÊNDICE E - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 4.****APÊNDICE F - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 5.**

**APÊNDICE G - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 6.****APÊNDICE H - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 7.****APÊNDICE I - Fotografia do primeiro e último dia de cultivo para a Condição 8.**



**APÊNDICE L - Curva de calibração para obtenção da concentração da Demanda Química de Oxigênio (DQO).**



**APÊNDICE M - Curva de calibração para a obtenção da concentração da suspensão microalgal do cultivo.**

