



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola Politécnica & Escola de Química
Programa de Engenharia Ambiental

Danielle Altomari Teixeira

PROCESSO DE SIMPLIFICAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE
MICROALGAS COM POTENCIAL DE APLICAÇÕES ENERGÉTICAS

Rio de Janeiro
2015



UFRJ

Danielle Altomari Teixeira

TÍTULO: Processo de simplificação de meio de cultura para a produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.
Área de concentração: Gestão Ambiental

Orientador: Cristina Aparecida Gomes Nassar, D.Sc.
Maria Isabel Rodrigues, D.Sc.

Rio de Janeiro
2015

Teixeira, Danielle Altomari Teixeira

Processo de simplificação de meio de cultura para produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas / Danielle Altomari Teixeira. – 2015 .
69p.

Dissertação (mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica e Escola de Química, Programa de Engenharia Ambiental, Rio de Janeiro, 2015.

Orientador: Cristina Aparecida Gomes Nassar
Maria Isabel Rodrigues

1. Microalgas. 2. Meio de cultura. 3. Planejamento Experimental. 4. Sustentabilidade. I. Nassar, Cristina . II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola Politécnica e Escola de Química. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danielle Altomari Teixeira

Processo de simplificação de meio de cultura para a produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovada pela Banca:

Sérgio Luiz Costa Bonecker, D.Sc., UFRJ.

Magali Christe Cammarota, D.Sc. UFRJ.

Mariângela Menezes, D.Sc., Museu Nacional, UFRJ

Rio de Janeiro
2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jane e José Carlos pelo grande amor, educação e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Cristiane e José Carlos pela torcida por mais essa conquista.

Ao meu amor Caio Rachid pelo amor, companheirismo e grande contribuição técnica neste trabalho. Despertou em mim o encanto de não só saber fazer ciência, mas sim de entender nas minúcias de cada processo, não se contentando apenas com o óbvio, para a compreensão de um fenômeno e por tornar a minha vida muito mais completa.

À Gina Vazquez e ao Ronalt Vital por me permitirem realizar esse sonho e por todo o apoio e carinho durante esse processo.

Meus sinceros agradecimentos ao Leonardo Bacellar, Bruno Lacava, Bruno Sardinha e Rafael Richard por todo o treinamento e formação na área de conhecimento de microalgas.

Às minhas amigas Érika Valoni e Vanessa Vólaro, por todo o apoio, força, carinho e amizade durante todos esses anos.

À professora Mariângela Menezes pela identificação da microalga estudada a nível de classe.

À minha orientadora Cristina Nassar pela orientação desse trabalho e por toda a contribuição técnica durante o período do mestrado.

À minha orientadora Maria Isabel Rodrigues por todo o ensinamento em DOE (*Desing of experiments*) e pelo lindo exemplo de amor e assistencialismo ao próximo.

RESUMO

TEIXEIRA, Danielle Altomari. **Título:** Processo de simplificação de meio de cultura para a produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Empresas do setor energético investem cada vez mais em processos sustentáveis, com os quais almejam alcançar os benefícios econômicos, com baixo impacto ambiental, atendendo as demandas energéticas das gerações atuais e futuras. Para a produção de biomassa algácea grandes volumes de meio de cultura são utilizados, o que representa uma parcela significativa dos custos de produção. Quanto maior a complexidade do meio de cultivo, em termos nutricionais, maior será o custo e o tempo de produção acarretando em maior preço final do produto. A otimização do meio de cultivo para a produção de biomassa de microalgas, corresponde a uma estratégia sustentável para a melhor eficiência na utilização dos recursos energéticos e naturais, com baixo impacto ambiental e benefício econômico. O presente estudo teve como objetivo a simplificação da composição do meio de cultura para produção de microalgas através da reavaliação dos componentes nutricionais e concentrações dos mesmos. Para tanto, foi utilizada a metodologia estatística de desenho de experimentos denominada DOE (em inglês *Design of Experiments*). Foram calculados os efeitos resultantes das interações dos compostos presentes no meio de cultivo sobre o crescimento da microalga Trebouxiophyceae e sobre o seu acúmulo lipídico. O meio de cultivo BG-11 modificado foi utilizado como base para otimização do meio de cultivo para a microalga Trebouxiophyceae. A utilização da ferramenta estatística de desenho de experimentos (DOE) permitiu uma redução significativa do número de ensaios, economizando tempo e recursos financeiros para a obtenção de resultados representativos. A partir dos resultados foi possível reduzir em nove componentes a composição química do meio BG-11 modificado, sendo que deste total, seis correspondem a compostos da solução de metais traço. O meio de cultivo simplificado apresentou concentração lipídica superior ao meio controle e deverá ser utilizado na etapa final dos cultivos destinados à obtenção de biomassa com aumento do conteúdo lipídico para fins energéticos. Os resultados dessa pesquisa promoveram uma redução de 38% no custo do meio simplificado em comparação ao meio de cultura controle, apresentando um custo final de R\$ 7,2 por 1000 litros de cultivo. Este valor possibilita uma significativa redução no preço da biomassa algácea produzida, gerando impacto positivo na precificação do produto final.

Palavras-chave: microalgas, meio de cultivo, desenho experimental (DOE), sustentabilidade

ABSTRACT

TEIXEIRA, Danielle Altomari. Processo de simplificação de meio de cultura para a produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas e ambientais. Rio de Janeiro, 2015. Dissertation (Master in Science – Environmental Engineering) – Environmental Engineering Program, Politechiche School and Chemistry School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Energy companies are increasingly investing in sustainable processes, to achieve economic benefits, low environmental impact, meeting the energy demands of current and future generations. For the production of algal biomass, large volumes of culture medium are used, which represents a significant proportion of the production costs. The production time and costs are directed correlated with the complexity of the culture medium in terms of chemical compounds. Therefore, the simplification of culture medium for the production of microalgae biomass corresponds to a sustainable strategy for the best efficiency of energy and natural resources use, low environmental impact and economical benefit. The present study aimed to simplify the composition of the culture medium for the production of microalgae through the revaluation of nutritional composition and concentration. In order to achieve that, we used the statistical methodology design of experiments called DOE (Design of Experiments). The BG-11 culture medium modified was used as base for optimizing the culture medium for Trebouxiophyceae. The effects resulting from the interaction within the nutritional compounds present in the culture medium over the growth of the microalgae Trebouxiophyceae and over its lipid accumulation was calculated. The use of the statistical methodology design of experiments (DOE) has enabled a significant reduction in the number of tests, saving time and financial resources. It was possible to remove nine chemical components on the composition of the BG-11 medium, and of this total, six correspond to compounds of trace metals solution. The optimized medium showed higher lipid concentration and should be use in the final stage of microalgae cultivation to obtaining biomass with higher lipid content for energy purposes. This research has promoted a reduction of 38% in cost of the optimized medium compared to the control medium. The optimized medium showed a final cost at R\$ 7,2 per 1000 liters of microalgae cultivation. This value enables a significant reduction in the final price of algae biomass, and therefore, a positive impact on the product final pricing.

Keywords: microalgae; culture; design of experiments (DOE); sustainability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 JUSTIFICATIVA	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 Matriz energética renovável	11
3.2 Microalgas: Oportunidades para a geração de bioenergia e bioprodutos.....	13
3.3 Cultivo de microalgas	19
3.4 Planejamento de Experimentos e Otimização de Bioprocessos.....	25
4 OBJETIVO GERAL	28
4.1 Objetivos específicos	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 Estratégia utilizada	29
5.2 Condições experimentais	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1 Primeiro DOE: Matriz de <i>Plackett e Burman</i> (PB 20).....	37
6.2 Segundo DOE: Matriz de <i>Plackett e Burman</i> (PB 16).....	45
6.3 Terceiro DOE: (Fracionado $2^{(4-1)}$)	52
6.4 Validação dos Resultados	55
6.5 Estimativa de preço do meio simplificado	61
7 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

A preservação do meio ambiente, em especial, o uso racional dos recursos naturais e a minimização dos impactos ambientais decorrentes dos processos industriais é uma questão de fundamental interesse coletivo e é exigida, cada vez mais, por uma sociedade ambientalmente consciente, em toda a cadeia produtiva.

As indústrias almejam a redução dos passivos ambientais e ao mesmo tempo a prosperidade econômica de seus negócios. Desse modo, precisam produzir produtos de modo a não prejudicar o meio ambiente e ao mesmo tempo com valores competitivos aos produtos tradicionais, baseados em processos energéticos que utilizam fontes fósseis. As fontes fósseis são finitas, e o conhecimento deste fato faz com que haja um grande interesse em explorar fontes energéticas renováveis, que estarão substituindo de forma progressiva a matriz energética atual.

A produção de energia renovável a partir de biomassa algácea corresponde a uma alternativa energética (PATHAK; CHAUDHARI; FULEKAR, 2013). Entretanto, para a sua aplicação comercial grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento deverão ser realizados para minimizar os gargalos tecnológicos referentes ao aumento da produção em larga escala.

Os sistemas de cultivo de microalgas possuem inúmeras questões técnicas e científicas para o aumento da geração de biomassa algácea. A escolha do tipo de microalga, atrelada a uma otimização nos processos de cultivo (tipos de reatores, nutrientes, luz, pH, temperatura, etc.) está diretamente associada à etapa inicial do processo (*upstream*), para a geração de biomassa algácea (REIS et al., 2014; RAWAT et al., 2013). Nesta etapa, há inúmeros custos operacionais significativos, relacionados principalmente ao consumo energético (insumos de compostos químicos, água e energia).

Após a obtenção da biomassa algácea, observam-se novamente custos operacionais elevados nos processos de *downstream*, como por exemplo: as etapas de coleta, separação, extração, em determinados casos, a purificação e as etapas de conversão (óleos) (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011). Entretanto, nos processos de *downstream* observam-se também custos ambientais crescentes, provenientes dos impactos ambientais significativos, resumidos neste caso, como a geração de resíduos sólidos e efluentes (ricos em nutrientes).

A otimização do processo produtivo de biomassa algácea é fundamental para a viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental. É uma alternativa com potencial para auxiliar na mudança progressiva da matriz energética atual.

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de tecnologias para as otimizações ao longo de todo processo produtivo é fundamental para a produção de produtos energéticos a partir de biomassa algácea. Estas tecnologias devem proporcionar o maior aproveitamento energético e a menor geração de impactos ambientais. Dessa forma, reduções significativas nos custos do processo das etapas de *upstream* e *downstream* devem ocorrer para viabilizar a produção em escala competitiva.

O processo de obtenção de biomassa algácea envolve o consumo de grandes volumes de meio de cultura. Quanto maior a complexidade, em termos de constituintes energéticos, maior será o preço do investimento, o que contribuirá em um incremento no preço final do produto.

A otimização de um meio de cultivo para a produção de biomassa de microalgas, corresponde a uma estratégia sustentável para a melhor eficiência na utilização dos recursos energéticos, minimizando os impactos ambientais sem comprometer a prosperidade econômica dos negócios.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Matriz energética renovável

As indústrias precisam atender a mercados aquecidos e fornecer produtos para atender o consumo sempre crescente. As fontes fósseis são finitas gerando interesse em explorar as fontes energéticas renováveis, que substituirão de forma progressiva a matriz energética atual.

Atualmente, não há alternativas energéticas capazes de competir com o mercado para os derivados de fontes fósseis, principal fonte energética, devido ao baixo preço dos mesmos. Entretanto, as expectativas futuras sugerem um crescente aumento no preço de mercado desses derivados, tornando as fontes de energia alternativas, como por exemplo, a biomassa algácea mais interessantes do ponto de vista econômico (LYKO; DEERBERG; WEIDNER, 2009). Dessa maneira, se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias de geração, processamento e conversão dos recursos energéticos renováveis, para torná-las competitivas.

A progressiva mudança da matriz energética por fontes renováveis tem sido foco de estudos em projetos de pesquisa e desenvolvimento, objetivando a aplicação direta em processos industriais (CHISTI; YAN, 2011; REIS et al., 2014). Os objetivos principais relacionam a obtenção de uma alta produtividade, com a viabilidade econômica do processo e baixo impacto ambiental, atendendo as demandas energéticas das gerações atuais e futuras.

A preservação dos recursos naturais, renováveis ou não, é crucial para que haja a sustentabilidade do processo. A exploração indiscriminada desses recursos pode resultar na escassez dos mesmos. Medidas de controle devem ser realizadas para que a taxa de exploração do recurso natural renovável seja menor ou igual a taxa de reposição ao ambiente por processos naturais (ENRÍQUEZ, 2003).

As microalgas constituem uma matéria prima renovável e os estudos para a sua utilização como fonte de energia, não são recentes. No final da década de 70, com a crise do petróleo, as pesquisas para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas se intensificaram e muitos investimentos foram realizados com o propósito principal de cunho econômico. Entretanto, com a subsequente queda do preço do barril de petróleo, houve uma significativa redução de incentivo às pesquisas de biocombustíveis (CAMPBELL; BEER; BATTEN, 2011).

O fomento às pesquisas com microalgas para biocombustíveis foi novamente intensificado a partir de 2006, com o intuito de desenvolver tecnologias que possam viabilizar economicamente a produção desses biocombustíveis. Embora ainda não sejam comercializados, esses biocombustíveis contribuirão para uma futura substituição das fontes fósseis de energia. Neste momento, as motivações estão calcadas no alcance da sustentabilidade. O viés ambiental passa a ter um peso maior nos processos de tomada de decisão do desenvolvimento e aplicação de produtos energéticos de base renovável (CHISTI; YAN, 2011; LYKO; DEERBERG; WEIDNER, 2009; SHELDON, 2011).

Muitas empresas de biotecnologia foram criadas para alavancar os processos de produção e comercialização dos biocombustíveis de algas (Tabela 1). O crescimento do seguimento é impulsionado pelas perspectivas econômicas promissoras. Contudo, a viabilidade econômica ainda depende de otimizações e desenvolvimento de tecnologias eficientes durante todo o processo produtivo e de conversão do produto alvo (CHISTI; YAN, 2011).

Tabela 1: Empresas que almejam a comercialização dos biocombustíveis de microalgas (CHISTI; YAN, 2011).

Empresa	Localização	Endereço Eletrônico
Algenol Biofuels	Bonita Springs, FL, USA	www.algaenolbiofuels.com
Aquaflow	Nelson, New Zealand	www.aquaflowgroup.com
Aurora Algae Inc.	Hayward, CA, USA	www.aurorainc.com
Bioalgene	Seattle, WA, USA	www.bioalgene.com
Bionavitas Inc.	Redmond, WA, USA	www.bionavitas.com
Livefuels Inc.	San Carlos, CA, USA	www.livefuels.com
Petroalgae Inc.	Melbourne, FL, USA	www.petroalgae.com
Sapphire Energy Inc.	San Diego, CA, USA	www.sapphireenergy.com
Seamibiotic Ltd.	Tel Aviv, Israel	www.seamibiotic.com
Solazyme Inc.	San Francisco, CA, USA	www.solazyme.com
Solix Biofuels Inc.	Fort Collins, CO, USA	www.solixbiofuels.com
Synthetic Genomics Inc.	La Jolla, CA, USA	www.syntheticgenomics.com

O cultivo autotrófico (fonte de energia do tipo luminosa) de microalgas utiliza grandes volumes de água e nutrientes, associados à presença de luz e gás carbônico (fonte inorgânica de carbono). Devido à complexidade de alguns meios de cultivo, o custo financeiro e os impactos ambientais associados aos mesmos são bastante elevados. O acréscimo de substâncias (ex. N, P, K, Mg, etc.) utilizadas como nutrientes nos meios de cultivo de microalgas, resulta na elevada emissão de

gases do efeito estufa e consumo de energia, contribuindo de forma negativa no ciclo de vida dos processos produtivos de microalgas (CLARENS et al., 2009, 2011).

Impactos ambientais significativos também se estendem ao processo de cultivo, no qual o excesso de nutrientes nos meio de cultivo pode contribuir para a ocorrência do fenômeno de eutrofização dos corpos hídricos, quando ocorre descarte de água residual após tratamento inadequado (ABDEL-RAOUF, 2012; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

Uma alternativa para minimizar os custos ambientais associados à produção de microalgas é a utilização de efluentes industriais. Efluentes ricos em nitrogênio e fósforo são um passivo ambiental para as indústrias, e podem ser direcionados para o cultivo de microalgas. As microalgas utilizam os nutrientes presentes no efluente para seu crescimento, reduzindo a demanda bioquímica de oxigênio dele, funcionando como um complemento para o tratamento das águas. Assim, ao mesmo tempo que o efluente é tratado, se minimizam os impactos ambientais provenientes dos processos de exploração e produção dos nutrientes utilizados nos meios de cultivo, e reduz-se o custo de produção das microalgas (ABDEL-RAOUF, 2012; SORATANA; LANDIS, 2011). Dessa forma, a redução no número e/ou concentração dos componentes do meio de cultivo se faz necessária para o aumento na eficiência em termos de produtividade, custos de produção e impactos ambientais.

Em prol de uma maior eficiência na utilização dos recursos energéticos e naturais pode-se destacar como uma estratégia sustentável a otimização dos meios de cultura, destinados a produção de microalgas, com fins de aplicações energéticas e ambientais. O consumo otimizado de nutrientes contribui para o aumento da sustentabilidade nos cultivos em larga escala de microalgas (CLARENS et al., 2009).

3.2 Microalgas: Oportunidades para a geração de bioenergia e bioprodutos

As microalgas não constituem uma designação taxonômica única, possuindo enorme diversidade em termos filogenéticos, morfológicos e fisiológicos. Elas são divididas em diferentes grupos, incluindo as algas verdes (Figura 1), verde amareladas, vermelhas, castanhas, douradas e azuladas (cianobactérias) (RASHID et al., 2014).

Esse grupo de organismos apresenta diferentes adaptações e relações ecológicas em resposta a ambientes diversificados. O termo microalga na indústria

incorpora dois grandes grupos, que são as microalgas procarióticas fotoautotróficas (cianobactérias) e as microalgas eucarióticas (DEMAZEL, 2008).

Algumas das vantagens da utilização de microalgas na indústria são: apresentam um crescimento rápido podendo sintetizar e acumular 20 - 77 % do seu peso seco em lipídios (Tabela 2), que são armazenados no citoplasma na forma de corpos ou inclusões lipídicas (CHISTI, 2007; MUTANDA et al., 2011); crescem em diferentes tipos e qualidades de água (doce, salina, água produzida, esgoto sanitário, vinhaça – efluente da indústria sucroalcooleira); não dependem de regime de safras para sua produção; conseguem crescer e se adaptar a uma diversidade de ambientes e produzindo diversos compostos químicos - inclusive biomoléculas de alto valor agregado - podendo atender a um mercado diversificado (WILLIAMS; LAURENS, 2010).



Figura 1: Diversidade morfológica das microalgas. A) *Chlorella* sp. (aumento de 1000x); B) *Tetraselmis gracilis* (aumento de 1000x); C) *Desmodesmus* sp. (aumento de 1000x).

Uma grande versatilidade de aplicações biotecnológicas é atribuída às microalgas. Na área de bioenergia a produção de microalgas tem sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos visando à produção de combustíveis. Estes microrganismos possuem grande potencial para a produção de óleos (triglicerídeos e hidrocarbonetos) que podem ser convertidos em biodiesel. Podem também contribuir para a produção de bio-hidrogênio, metano, bio-querosene de aviação e mais recentemente, bioetanol (BENEMANN JR, 2010; BRENNAN; OWENDE, 2009; DAMASO et al., 2014).

Tabela 2: Teor de óleo de diferentes microalgas (CHISTI, 2007)

Espécie de Microalga	Teor de óleo (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cohnii Cryptocodinium</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Na área ambiental microalgas podem ser utilizadas em processos de biorremediação, tratamento de efluentes (água produzida, efluentes de refinarias, esgoto doméstico, etc.), fixação biológica do nitrogênio - biofertilização para a agroindústria- e como bioindicadores ambientais (IYOVO, DU, AND CHEN 2010; PITTMAN, DEAN, AND OSUNDEKON 2011; ABDEL-RAOUF 2012; HODAIFA ET AL. 2013; ALQUEZAR, GLENDENNING, AND COSTANZO 2013; DESROSIERS ET AL. 2013).

No tratamento de efluentes as microalgas possuem a capacidade de remover os compostos de nitrogênio e fósforo minimizando o potencial de eutrofização dos corpos hídricos (CHU et al., 2014; RAWAT et al., 2013). Algumas microalgas, como por exemplo, *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Chlamydomonas reinhardtii* possuem também a capacidade de absorverem alguns metais pesados, como por exemplo, Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} e Hg^{2+} . Dessa forma, podem ser adicionalmente utilizadas na etapa final do tratamento de efluentes, realizando um polimento, onde os metais serão incorporados às células de microalgas sob diferentes formas de assimilação e incorporação (REIS et al., 2014).

As microalgas também podem ser utilizadas como bioindicadores, pois possuem altas taxas de reprodução e ciclos de vida curtos, caracterizando, dessa forma, como bioindicadores ideais para impactos de curta duração e por permitirem a detecção de agentes poluidores em baixas concentrações. As microalgas possuem uma grande diversidade de espécies que possuem ampla distribuição

entre diferentes ecossistemas e regiões geográficas. São produtores primários e, por este fato, são diretamente afetadas pelas alterações de fatores químicos e físicos no meio ambiente. Apresentam sensibilidade a alguns poluentes com alterações em seu metabolismo, possuindo a capacidade de transformarem quimicamente e bioacumularem alguns poluentes ambientais (DESROSIERS et al., 2013; TORRES et al., 2008). À vista disso, podem reduzir a exposição aos contaminantes, para os organismos que não são consumidores de microalgas.

Uma desvantagem da utilização das microalgas como bioindicadores é a incapacidade de avaliar o efeito de contaminações de poluentes persistentes em baixas concentrações em um longo período de tempo, uma vez que, baixas taxas de poluentes no conteúdo intracelular das microalgas podem não ser suficientes para induzir alterações bioquímicas importantes. As microalgas por estarem na base da cadeia alimentar, servem de alimento para níveis tróficos superiores que podem vir a acumular compostos tóxicos através da biomagnificação. Desse modo, as microalgas podem favorecer a captação indireta dos poluentes tóxicos para os organismos superiores (BLANCO; NADAOKA; YAMAMOTO, 2008; CARDOSO et al., 2013; MAZNAH et al., 2010; TORRES et al., 2008).

Na área alimentar, a biomassa de microalgas pode ser utilizada como fonte de proteínas, carboidratos e lipídeos (óleos naturais) servindo como suplemento nutricional. Moléculas de alto valor agregado também podem ser produzidas pelas microalgas como os pigmentos, biopolímeros, ácido docosa-hexaenóico (ácido graxo do tipo ômega 3) (DAMASO et al., 2014; RAWAT et al., 2013).

Atualmente, um dos principais interesses no setor de biocombustíveis de algas é a produção de óleos vegetais (triglicerídeos). Algumas microalgas acumulam grandes quantidades destes óleos quando submetidas a condições nutricionais limitantes. Nestas condições, há uma redução dos processos fotossintéticos, alterando a dinâmica de formação de moléculas com potencial energético, como por exemplo, o conteúdo lipídico (BENEMANN JR, 2010).

Fatores ambientais tais como intensidade luminosa, temperatura, restrição de nutrientes e salinidade estão relacionados à produção e composição dos lipídeos INTRACELULARES (HU ET AL. 2008; EL-SHEEKH, ABOMOHR, AND HANELT 2013A; XIA ET AL. 2013). Variações nesses fatores induzem o acúmulo lipídico nas microalgas, porém os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão claramente elucidados.

A restrição de nitrogênio é apresentada como um dos principais indutores para a síntese lipídica nas microalgas (EL-SHEEKH; ABOMOHRRA; HANELT, 2013b; TAN; LIN, 2011).

A composição bioquímica da biomassa algácea é diferenciada de acordo com a espécie. A determinação do processo e molécula (s) alvo para a produção de energia e coprodutos é realizada através de uma avaliação da composição da biomassa, em termos de lipídeos, carboidratos e proteínas. A escolha é baseada na geração do maior aproveitamento energético e de valor agregado (CHERUBINI, 2010; GHATAK, 2011; RAWAT et al., 2013).

Os cultivos de microalgas em uma escala superior têm como objetivo a obtenção de biomassa em grandes quantidades com características específicas para a obtenção de produtos alvos. De uma maneira geral, quando a produtividade almejada é alcançada, as microalgas são coletadas e separadas por diferentes tipos de processo, e as moléculas alvo são extraídas para posterior conversão em produtos. A Figura 2 apresenta, de forma simplificada, alguns produtos obtidos dos cultivos de microalgas e mostra, no caso do produto biodiesel, uma relação ilustrativa do possível uso do dióxido de carbono (CO_2), liberado pelas indústrias, como insumo para a geração de biomassa algácea. Em escalas superiores, a utilização de CO_2 proveniente de processos industriais, constitui uma forma interessante de utilização de efluentes gasosos, como insumos de processos para geração de biomassa algácea (BRENNAN; OWENDE, 2009; JONES; MAYFIELD, 2012).

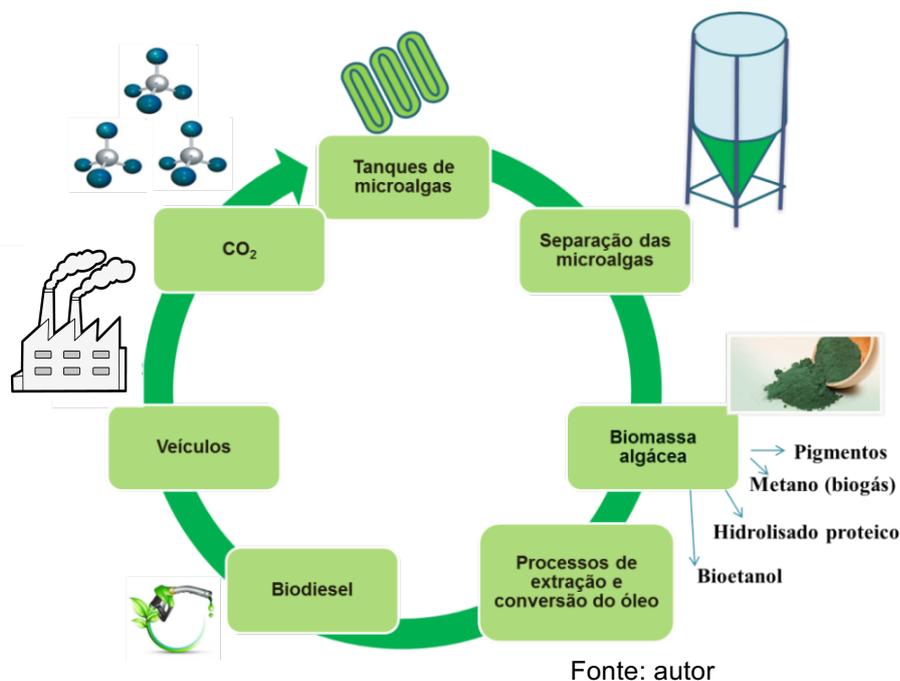


Figura 2: Representação de oportunidades para a geração de produtos obtidos a partir da biomassa algácea e a utilização de CO₂ residual de processos, como insumo para a geração de biomassa algácea.

No presente trabalho foi estudada uma microalga da divisão Chlorophyta da classe Trebouxiophyceae. As algas da divisão Chlorophyta são designadas como algas verdes e apresentam uma distribuição cosmopolita com grande diversidade morfológica. Seus pigmentos principais são as clorofilas a e b e pigmentos acessórios como os carotenóides (RICHMOND, 2004).

A Classe Trebouxiophyceae possui uma grande diversidade morfológica podendo apresentar microalgas unicelulares, filamentosas ou em forma de pequenas lâminas; possuem reprodução assexuada por autósporos ou zoósporos; são autotróficas e dulciaquícolas. Esta classe possui cinco ordens (Chlorellales, Microthamniales, Phyllosiphonales, Prasiolales e Trebouxiales) e aproximadamente 650 espécies (GUIRY, M.D. & GUIRY, 2014).

Em estudos de prospecção de microalgas com potencial para a produção de biocombustíveis foram identificadas microalgas da classe Trebouxiophyceae, como por exemplo, a *Chlorella* sp. e *Botryococcus braunii* (JUSOH et al., 2015; MENDES et al., 2012; TALEBI et al., 2013).

3.3 Cultivo de microalgas

As microalgas bem como os demais microrganismos necessitam de requisitos básicos para o crescimento tais como: fonte de energia, água, nutrientes, pH e temperatura.

A fonte de energia utilizada pode ser a do tipo luminosa para o crescimento autotrófico; química através de um composto orgânico para o crescimento heterotrófico (FRANCO et al., 2013) ou ambas para um crescimento denominado mixotrófico, no qual a microalga pode crescer tanto por uma condição fototrófica, heterotrófica ou ambas (REIS et al., 2014). Em sistemas *outdoor* a energia solar natural é utilizada e nos sistemas *indoor* a energia luminosa é a artificial.

As microalgas não necessitam de água potável para o seu crescimento, podendo utilizar águas salinas e hipersalinas, água de produção de petróleo, esgoto sanitário, efluentes de refinaria e outros tipos, desde que, não apresentem compostos de alta toxicidade para as microalgas.

Devido à grande diversidade de microalgas as exigências nutricionais são específicas e irão diferenciar na quantidade e nos tipos de compostos químicos necessários para que as taxas de crescimento sejam mantidas na faixa ótima desejada. Carbono, nitrogênio e fósforo são elementos essenciais enquanto que manganês, magnésio, cobalto, cálcio, enxofre, ferro, potássio, sódio e hidrogênio são usados como elementos traços (JOHNSON; WEN, 2009; YEESANG; CHEIRSILP, 2011). Os nutrientes usados em pequenas concentrações, referidos anteriormente como elementos traço são importantes para o perfeito funcionamento do sistema fisiológico das microalgas.

O nitrogênio pode ser assimilado pelas microalgas na forma de nitrato, nitrito amônia e ureia, sendo que, cada espécie possui uma forma preferencial de assimilação. As reações químicas provenientes da assimilação do nitrato possuem uma relação direta com o pH do meio de cultivo, e, que por sua vez, influenciam diretamente nas taxas de crescimento das microalgas. Altas absorções de amônia também influenciam o pH do meio e neste caso, provocam uma significativa redução do pH ($\text{pH} < 6,0$) dificultando ou até mesmo cessando o crescimento das microalgas. (RASHID et al., 2014).

Em composições tradicionais de meios de cultura, como por exemplo, os meios BG-11 modificado (ALLEN; STANIER, 1968; ALLEN, 1968; RIPPKA et al.,

1979) e F2 (GUILLARD, 1975) utilizam nitrato e sua aplicação se torna aceitável em condições de laboratório. Quando se almeja o aumento da produção, a utilização do nitrato acarreta em um significativo incremento no preço final da biomassa algácea e, por esse motivo, a sua utilização, em altas concentrações, corresponde a uma inviabilização do processo.

A ureia é preferencialmente utilizada em cultivos de larga escala, devido ao seu baixo custo e por auxiliar no aumento da resistência, dificultando a contaminação por protozoários e outras algas, sendo o seu uso, caracterizado como uma das estratégias para o alcance da economicidade do processo de produção de biomassa (XIA et al., 2013). As células de microalgas absorvem a ureia de forma simples através da membrana plasmática e a sua utilização está condicionada às reações de conversão da ureia em amônia e bicarbonato (RASHID et al., 2014).

O fósforo é um elemento essencial nos processos de conversão de energia e transferência de informação genética nos microrganismos (RASHID et al., 2014). Para a síntese de lipídeos, a razão nitrogênio e fósforo é considerada um fator que estimula o aumento do conteúdo lipídico nas microalgas. Contudo, ainda não há um consenso em relação a razão de nitrogênio e fósforo ideal para o aumento do teor lipídico (CHU et al., 2014; RASHID et al., 2014; XIN et al., 2010).

Para a produção de biomassa algácea grandes volumes de meio de cultura são utilizados em processos de aumento de escala. Podendo atingir milhões de litros em tanques abertos com áreas de 10.000 m² ou maiores. Quanto maior a complexidade do processo produtivo, em termos de constituintes energéticos e de compostos químicos a serem utilizados, maior será o valor do investimento, podendo afetar a sua produção e até a sua comercialização.

A utilização de fertilizantes agrícolas para a formulação de meios de cultura é uma alternativa eficiente para a redução do custo final dos meios de cultivo (CAMPAÑA-TORRES et al., 2012). Os meios de cultivo utilizados em sistemas de produção em larga escala devem ser simples em termos de concentração e tipos de constituintes energéticos. O uso de efluentes ricos em fósforo e nitrogênio contribui simultaneamente para minimização dos custos de produção e redução dos impactos ambientais. O impacto ambiental é reduzido através do consumo por parte microalgas dos macronutrientes (nitrogênio e fósforo) que ocasionam a eutrofização dos corpos hídricos (CHINNASAMY et al., 2010; RAWAT et al., 2013).

A otimização dos meios de cultura ocorre como resultado da aplicação de um conhecimento adquirido sobre a seleção dos nutrientes e suas respectivas concentrações (RASHID et al., 2014; RAWAT et al., 2013). Este conhecimento auxilia no direcionamento do cultivo (aumento de biomassa e/ou acúmulo de lipídeos) para fins energéticos. Esta otimização faz parte de uma estratégia sustentável para melhorar a eficiência sobre a utilização dos recursos energéticos e naturais. Dessa forma, contribuindo também para a economicidade do processo produtivo.

De forma análoga aos nutrientes, fatores como temperatura e pH também devem ser estudados de forma a definir as respectivas faixas ótimas para o cultivo das diferentes microalgas. A agitação, ocasionada por turbulência mecânica ou por bolhas de ar é utilizada para minimizar problemas relacionados com uma baixa transferência de massa de CO₂. A baixa transferência de massa pode acarretar em uma diminuição da produtividade. Além disso, a agitação minimiza os efeitos de auto sombreamento das microalgas. Quando há uma alta densidade celular, a falta de agitação dificulta a absorção de luz por cada célula de microalga (BRENNAN; OWENDE, 2009; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

O termo *upstream* é comumente aplicado em processos biotecnológicos com microalgas, para designar a primeira etapa do processo produtivo, como o objetivo de se produzir biomassa. Nesta etapa são realizadas atividades voltadas à seleção de microalgas, melhoramento genético e otimização das condições de cultivo (nutrientes, temperatura, pH, etc.).

A produção de microalgas em larga escala só se torna praticável, em termos de alta produtividade, em sistemas *outdoor*, na qual as microalgas são cultivadas em sistemas abertos (*open ponds*) ou fechados (fotobiorreatores) (CHISTI, 2007). As Figuras 3 e 4 exemplificam os diferentes sistemas de cultivos de microalgas *outdoor*.



Fonte: CENPES/PETROBRAS

Figura 3: Fotobiorreator desenvolvido pela equipe do CENPES/PETROBRAS em parceria com a UFRJ/EQ.



Fonte: CENPES/PETROBRAS

Figura 4: Tanques abertos (*open ponds*) da planta piloto da PETROBRAS em parceria com a UFRN localizada em Extremoz, no Rio Grande do Norte.

O *raceway* (um tipo de *open pond*) é um sistema simples e contínuo para o crescimento das microalgas. Ele consiste em um canal de recirculação de circuito fechado, com uma profundidade média de 0,3 m, construído geralmente em PVC, concreto ou terra compactada coberta com filme plástico (CHISTI, 2007; TERRY; RAYMOND, 1985). O fluxo contínuo de microalgas é guiado em torno de curvas e é misturado e distribuído, por exemplo, por uma roda de pás usada também para evitar a sedimentação (EDUARDO et al., 2014). A Figura 5 apresenta uma representação simples de um sistema tipo *raceway* com um sistema de movimentação do fluido do tipo roda de pás.

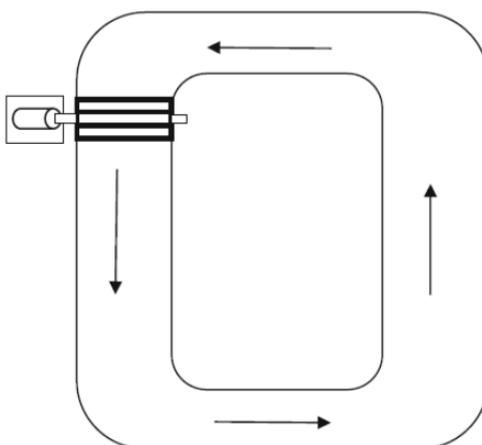


Figura 5: Representação simples de um sistema tipo *raceway* com mistura e movimentação do fluido por meio de rodas de pás (EDUARDO et al., 2014).

Os fotobiorreatores (PBRs) são sistemas fechados, constituídos de materiais transparentes, permitindo a passagem da luz, para o crescimento das microalgas em condições autotróficas. Nestes fotobiorreatores a aeração é importante para evitar o efeito do auto sombreamento das microalgas permitindo, assim, que todas as células estejam em contato com a energia luminosa. A Figura 6 apresenta um modelo simples de fotobiorreator.

Os cultivos de microalgas em fotobiorreatores são geralmente mais caros dos que os realizados em *raceways*. Entretanto, apresentam as maiores produtividades (LOURENÇO, 2006). Devido às questões econômicas os cultivos de microalgas em *raceways* são os mais utilizados em larga escala e grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento são realizados para a obtenção de uma alta produtividade. Uma comparação simples das características de diferentes condições e sistemas de cultivo é apresentada na Tabela 3 (CHEN et al., 2011).

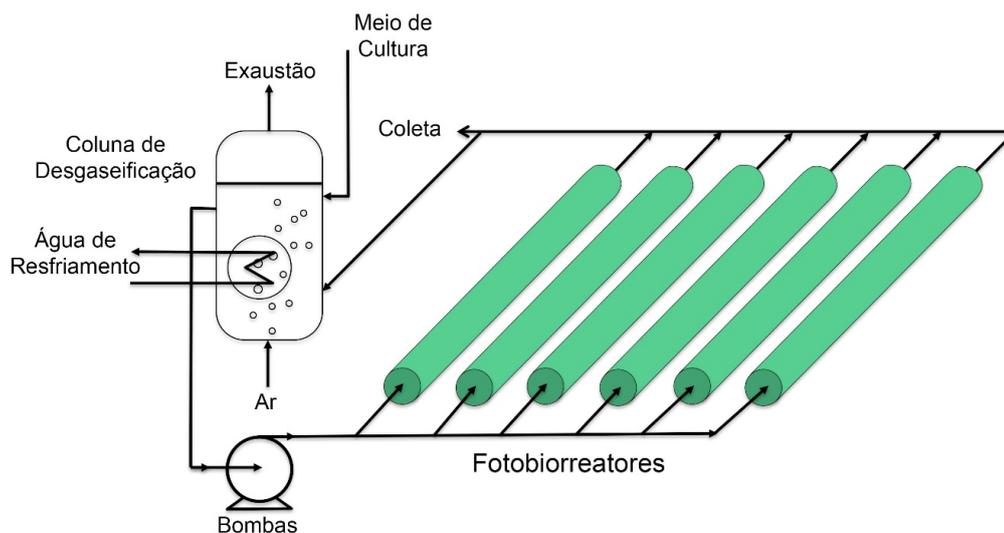


Figura 6: Representação de um fotobiorreator para cultivo de microalgas (adaptado de Jorquera et al. 2010).

Tabela 3: Comparação de diferentes condições de cultivo. Fonte: (CHEN et al., 2011).

Condições de Cultivo	Fonte de Energia	Fonte de Carbono	Tipo de Reator	Custo
Fototrófico	Luz	Inorgânico	<i>Open pond</i> ou fotobiorreator	Baixo
Heterotrófico	Compostos orgânicos	Orgânica	Fermentador convencional	Médio
Mixotrófico	Luz e compostos orgânicos	Inorgânica e orgânica	Fotobiorreator	Alto

A integração dos fotobiorreatores e dos *open ponds* nos processos de produção, constitui um sistema híbrido de cultivo. A sua utilização tem como o objetivo a exploração dos benefícios individuais de cada sistema em prol de um objetivo final comum. O objetivo almejado é a alta produtividade em massa de microalgas com perfil para a exploração de um determinado produto alvo. Em um primeiro estágio de cultivo, os fotobiorreatores são utilizados para o alcance de altas concentrações de biomassa com ausência de contaminantes indesejados. E em um segundo estágio, a biomassa produzida nos fotobiorreatores é transferida para os *open ponds* para a aplicação dos fatores de estresse, como por exemplo, a manipulação dos elementos nutricionais do meio de cultivo. Além disso, proporciona também o cultivo simultâneo de mais de uma espécie de interesse (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; RAWAT et al., 2013).

3.4 Planejamento de Experimentos e Otimização de Bioprocessos

As técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos auxiliam na otimização de processos e produtos em prol de uma minimização de tempo e custos. Simultaneamente tem-se uma maximização de produtividade, rendimento e qualidade de produto (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

O planejamento experimental necessita da integração de três fatores: o processo a ser otimizado, a estatística e o bom senso (Figura 7). A integração desses fatores é indispensável para o alcance dos objetivos esperados (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

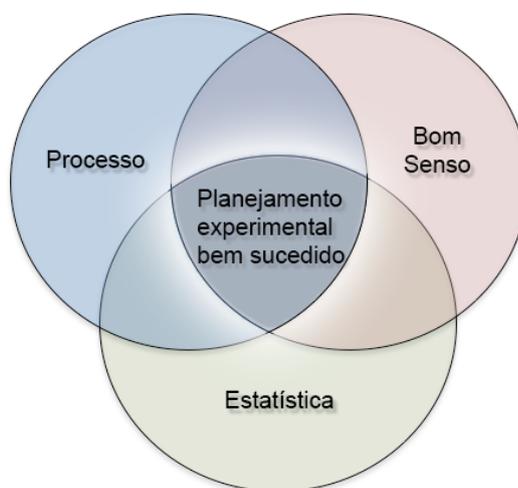


Figura 7: Representação da interação entre o conhecimento do processo, a estatística e o bom senso no momento da definição do planejamento experimental (adaptado de RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A metodologia baseia-se, em um primeiro momento, na seleção das variáveis principais que podem influenciar na resposta do processo em otimização. A cada variável são atribuídos níveis que correspondem a diferentes condições dessa variável. Dependendo do número de variáveis uma estratégia sequencial de planejamento é escolhida. Conforme o processo a ser otimizado, mais de um delineamento sequencial pode ser utilizado. Após a obtenção dos resultados a análise estatística será realizada para a análise dos efeitos das variáveis sobre a resposta. Dessa forma, haverá a interpretação dos resultados sob a óptica dos efeitos, sendo esses positivos, negativos ou não estatisticamente significativos (PARK, 2007; RODRIGUES; IEMMA, 2009). A Figura 8 apresenta uma representação de um processo geral de Desenho de Experimentos (DOE) (adaptado de PARK, 2007; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A definição da melhor estratégia de planejamento experimental está diretamente relacionada ao número de fatores que se deseja estudar (variáveis independentes) e com o conhecimento sobre o processo de interesse (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A Tabela 4 apresenta de forma resumida a seleção da melhor estratégia de planejamento experimental de acordo com o número de variáveis ou fatores de interesse.

Tabela 4: Tipos de planejamentos experimentais possíveis em função do número de variáveis envolvidas (adaptado de Rodrigues and Lemma 2009).

Número de variáveis	Tipo de planejamento experimental
2	Delineamento composto central rotacional (DCCR) ou delineamento composto central (DCC).
3	Delineamento composto central rotacional (DCCR) ou delineamento composto central (DCC).
4	DCCR ou fracionado $2^{(4-1)}$ ou <i>Plackett & Burman</i> (matriz especial - PB 12).
5	DCCR ou Fracionado $2^{(5-1)}$ ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 12) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 16).
6	Fracionado $2^{(6-2)}$ ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 12) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 16) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 20) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 24).
7	Fracionado $2^{(7-3)}$ ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 12) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 16) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 20) ou <i>Plackett & Burman</i> (PB 24).
8 ou mais	Para 8 variáveis, na fase de <i>screening</i> podemos usar fatoriais fracionados ou de <i>Plackett & Burman</i> (PB), respeitando o número de pelo menos 4 ensaios a mais que o número de variáveis e adicionar as repetições no ponto central. Acima de 9 fatores, o planejamento de PB é o mais recomendado.

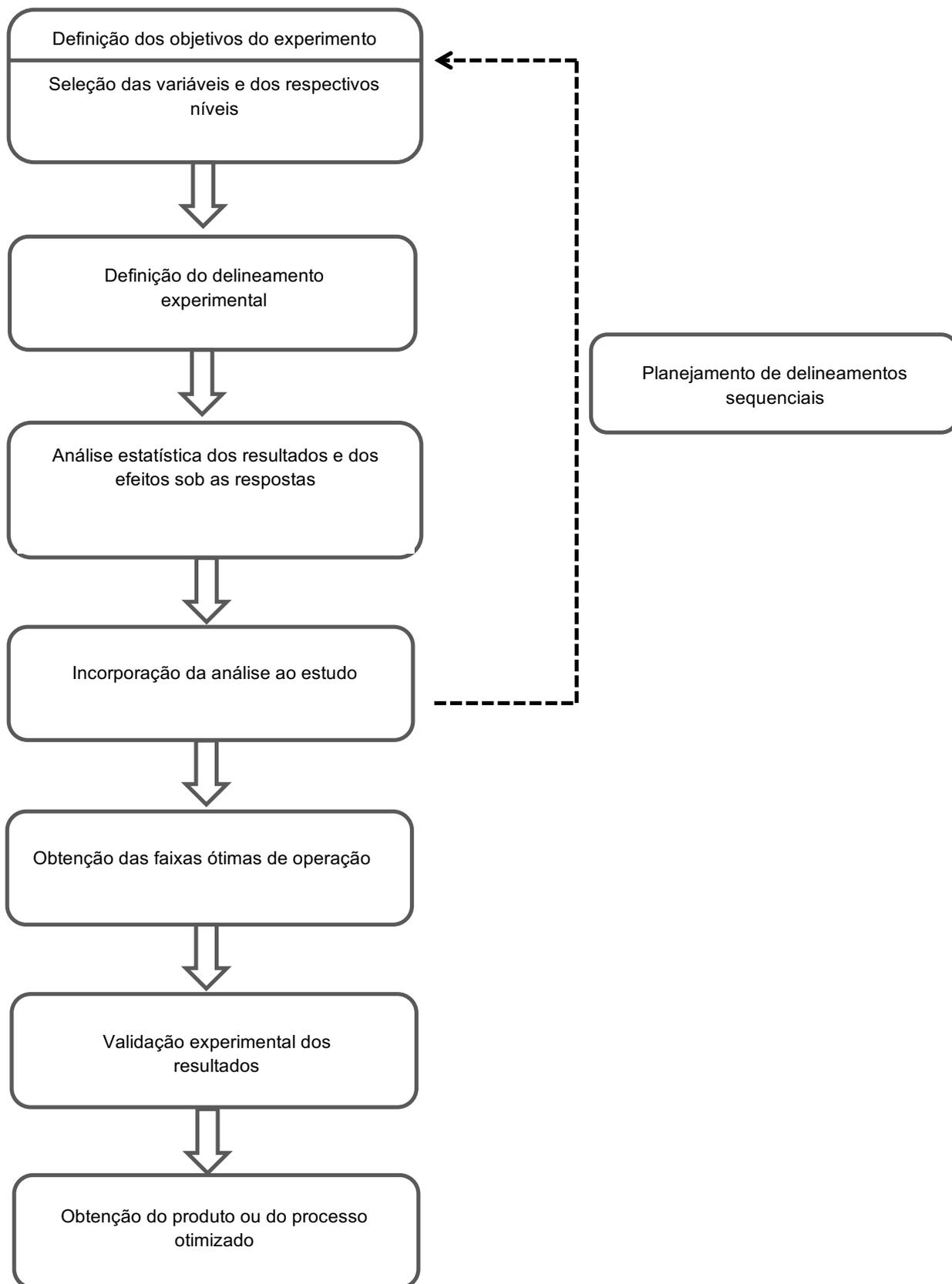


Figura 8: Representação de um processo geral de Desenho de Experimentos (DOE) (adaptado de PARK, 2007; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

4 OBJETIVO GERAL

Determinar o meio de cultura mais simples e econômico, em termos de constituintes energéticos (simplificado), que tenha potencial de ocasionar o crescimento celular e o incremento lipídico da biomassa algácea de forma simultânea.

4.1 Objetivos específicos

- I. Otimizar o meio de cultivo da microalga Trebouxiophyceae para a contribuir com a economicidade do processo de produção de biomassa com fins energéticos;
- II. Avaliar o efeito da interação de cada composto químico presente no meio de cultivo sobre a produção de biomassa algácea e produção de lipídeos;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Estratégia utilizada

O estudo de otimização de meio de cultura foi realizado através da aplicação da ferramenta estatística de Desenho de experimentos (DOE), no laboratório da gerência de Biotecnologia do CENPES e contou com a consultoria da empresa *Protimiza* (Profa. Maria Isabel Rodrigues).

O inóculo utilizado foi cedido por uma parceria com a Universidade Federal de Viçosa e foi inicialmente classificado como *Scenedesmus* sp. Após a realização do estudo, uma amostra da microalga foi encaminhada para especialistas do departamento de Botânica do Museu Nacional/UFRJ, para confirmação da classificação por taxonomia clássica e biologia molecular e foi verificado que a microalga estudada pertencente à classe Trebouxiophyceae. Até o presente momento, os especialistas ainda não chegaram ao gênero da microalga estudada.

A escolha inicial da microalga *Scenedesmus* sp. para o estudo de otimização do meio de cultivo ocorreu, devido ao fato, de que esta microalga é utilizada principalmente em processos de tratamento de água e de esgoto doméstico. Dessa forma, seria realizado a simplificação de um meio de cultivo para uma microalga com potencial de tratar a água e simultaneamente produzir biomassa para fins energéticos.

Foram estabelecidas inicialmente as variáveis a serem estudadas da composição do meio de cultivo, para o crescimento da microalga em estudo. A partir desta etapa foram determinadas, em conjunto com a *Protimiza*, as estratégias para cada sequência de experimentos a ser realizada. Ao final de cada delineamento experimental, os resultados foram avaliados utilizando o *software Protimiza Experimental Design* (<http://experimental-design.protimiza.com.br/>) e novas estratégias foram determinadas.

O meio de cultura definido como padrão para ser otimizado foi o BG-11 modificado (ALLEN; STANIER, 1968; ALLEN, 1968; RIPPKA et al., 1979) (Tabela 5). Este meio de cultivo possui quatorze variáveis, e neste trabalho, foram consideradas apenas duas condições (+1 e -1) para cada uma das variáveis (Tabela 6). Cada condição (níveis) corresponde a concentrações definidas dentro de uma faixa de interesse. Por exemplo, para a variável ácido cítrico, no primeiro delineamento, a

condição +1 correspondeu a 10 mg l⁻¹ enquanto que condição -1 foi igual a 2 mg l⁻¹. O nível zero corresponde ao ponto médio (concentração padrão do meio).

A estratégia inicial foi a de utilizar a matriz de *Plackett e Burman* (PB) com vinte ensaios (PB 20), sendo adicionados os quatro pontos centrais (Tabela 7).

Uma vez realizado este primeiro DOE para análise dos efeitos destas quatorze variáveis, na produção de biomassa, foi definido o delineamento PB 16. Após a realização deste delineamento foi selecionado o Fracionado 2⁽⁴⁻¹⁾. A escolha do tipo de estratégia de planejamento experimental foi realizada em função do número das variáveis que foram identificadas como relevantes ao processo e que apresentaram potencial para otimizações. Para cada planejamento as faixas de estudo (níveis) foram ajustadas de acordo com os resultados pretéritos de cada planejamento realizado anteriormente. Dessa maneira, uma estratégia sequencial de otimização do processo foi realizada. Após o término da estratégia sequencial de otimização foi realizada uma etapa de validação da condição otimizada.

Tabela 5: Composição do meio BG-11 modificado.

Nutrientes	mg l ⁻¹
Urea	530
MgSO ₄ .7 H ₂ O	75
CaCl ₂ .2H ₂ O	36
KH ₂ PO ₄	61,06
Citrato Fe	6
Ácido Cítrico	6
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	2,86
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0404
MnSO ₄ .H ₂ O	0,017
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,391

Tabela 6: Variáveis do meio BG-11 estudadas e as respectivas concentrações para cada nível no primeiro delineamento (PB 20).

Variável	Níveis (mg l ⁻¹)		
	-1	0	1
Concentração inicial de microalgas	100	200	300
Ácido cítrico	2	6	10
Ureia	100	350	600
MgSO ₄ .7H ₂ O	50	75	100
EDTA dissódico	0	20	40
H ₃ BO ₃	0	2,5	5
MnSO ₄ .H ₂ O	0	0,1	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,6	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0	0,05	0,1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2	0,4	0,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02	0,05	0,08
FeCl ₃ .6H ₂ O	6	12	18
(NH ₂)H ₂ PO ₄	5	10	15
Salinidade	5000	15000	25000

5.2 Condições experimentais

A microalga estudada é da divisão Chlorophyta e da classe Trebouxiophyceae. O inóculo para os ensaios foi preparado em fotobiorreator de 5l, denominado estoque, cultivado em meio BG-11 com a salinidade 0,5%. Na etapa de validação, o inóculo foi preparado em fotobiorreator de mesmo volume (5l), porém com meio de cultivo, denominado controle, que vinha sendo utilizado na planta piloto da PETROBRAS para a produção de microalgas. A planta piloto, localizada em Extremoz, no Rio Grande do Norte é uma iniciativa do CENPES/PETROBRAS com parceira da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

No início de cada sequência de experimentos o inóculo foi preparado de modo a alcançar a concentração inicial desejada, para cada tipo de ensaio. Para o preparo do inóculo foi realizada a quantificação da biomassa do fotobiorreator estoque, pela determinação do peso seco, com desconto de cinzas. Após a verificação do valor de biomassa foi retirado do fotobiorreator 1/3 do volume total, para posterior centrifugação à 7000 rpm por cinco minutos e sucessivas lavagens com água destilada de igual salinidade do cultivo estoque (10g l⁻¹). A centrifugação foi realizada para retirar quaisquer resquícios de nutrientes em solução, que pudessem alterar as concentrações dos componentes químicos avaliados. O sobrenadante foi descartado e a biomassa concentrada foi ressuspensa em meio de cultura específico para cada tipo de ensaio.

Para a execução dos experimentos foram utilizados fotobiorreatores de vidro, com a capacidade de um litro, contendo diferentes composições de meio de cultura e concentrações de microalgas. Estes fotobiorreatores foram dispostos em capelas, contendo um painel de luz no seu interior, com fotoperíodo controlado (12 horas claro/ 12 horas escuro) e temperatura aproximada de 23°C. Os fotobiorreatores estão ilustrados na Figura 9.

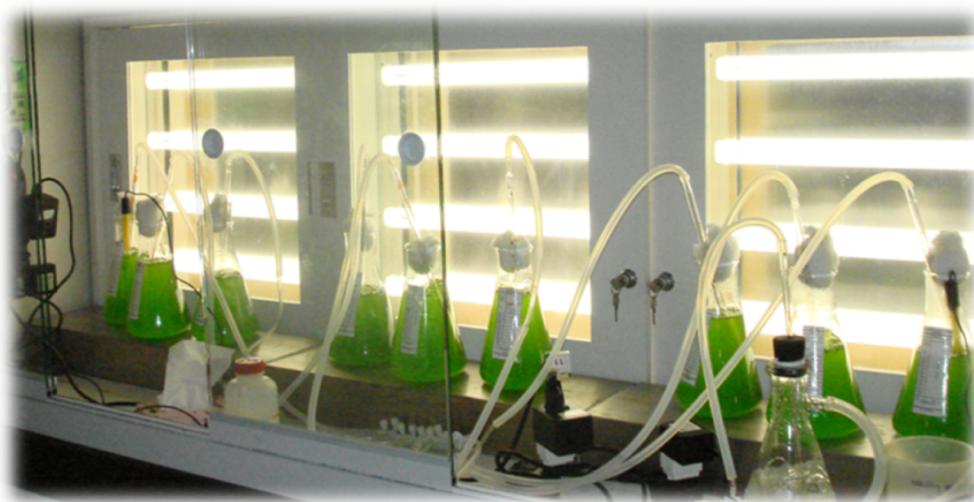


Figura 9: Distribuição dos fotobiorreatores na capela por painel de luz

Os fotobiorreatores, no caso deste experimento, realizados em frasco tipo *Erlenmeyer* foram aerados com um compressor de ar (marca *Boyu* vazão de 4,2 l min⁻¹), acrescidos da injeção de ar industrial disponibilizado no sistema da capela. Foi montado também um sistema de umidificação de ar para reduzir o efeito da evaporação ao longo do experimento (Figura 10).

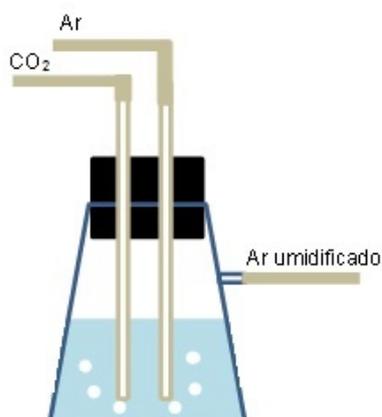


Figura 10: Ilustração do sistema de umidificação de ar

A injeção de CO₂ foi condicionada à regulação do pH, mantendo o mesmo na faixa de 6,0 - 6,5. A injeção de CO₂ foi controlada por uma válvula solenóide acoplada ao regulador de pH da marca *Milwaukee* modelo *SMS 122*.

As três réplicas de cada reator foram colocadas em posições diferentes no painel de luz com a finalidade de minimizar a diferença de intensidade luminosa em cada posição.

As análises de quantificação de biomassa foram realizadas pela determinação do peso seco por gravimetria, com desconto de cinzas, após o processo de calcinação. As análises de extração e quantificação dos lipídios foram realizadas utilizando a metodologia desenvolvida a partir do método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (WILLART, STIG, ROY NILSSON, 1959) no final de cada sequência de experimentos. Os resultados foram expressos em teor lipídico, que representa o percentual de lipídeos em função da biomassa seca.

Para a avaliação da concentração lipídica (g lipídeos l⁻¹ de cultivo), foi realizada a multiplicação do teor lipídico (g lipídeos g⁻¹ microalgas) pela biomassa algácea final por litro de cultivo (g microalgas l⁻¹ de cultivo).

Foram realizados sessenta e um ensaios através da seguinte estratégia sequencial: Matriz de *Plackett & Burman* PB 20 mais quatro pontos centrais, totalizando vinte e quatro ensaios (Tabela 7); Matriz de *Plackett & Burman* PB 16 mais quatro pontos centrais, totalizando vinte ensaios (Tabela 8); Fracionado 2⁽⁴⁻¹⁾ mais três pontos centrais, totalizando 11 ensaios (Tabela 9) e a etapa de validação com seis ensaios (Tabela 10).

Tabela 7: Matriz de ensaios definidos pela estratégia *Plackett e Burman* (PB 20) acrescidos de quatro pontos centrais (PC).

Ensaio	VALORES CODIFICADOS														VALORES REAIS (mg l ⁻¹)												
	Concentração inicial de microalgas	Ácido cítrico	Ureia	MgSO ₄ .7H ₂ O	EDTA dissódico	H ₃ BO ₃	MnSO ₄ .H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂) ₂ H ₂ PO ₄	Salinidade	Concentração inicial de microalgas	Ácido cítrico	Ureia	MgSO ₄ .7H ₂ O	EDTA dissódico	H ₃ BO ₃	MnSO ₄ .H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂) ₂ H ₂ PO ₄
E1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	300	2	600	100	0	0	0	0,2	0,1	0,2	0,08	6	15	25000
E2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	300	10	100	100	40	0	0	0,2	0	0,6	0,02	18	5	25000
E3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	100	10	600	50	40	5	0	0,2	0	0,2	0,08	6	15	5000
E4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	100	2	600	100	0	5	0,2	0,2	0	0,2	0,02	18	5	25000
E5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	300	2	100	100	40	0	0,2	1	0	0,2	0,02	6	15	5000
E6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	300	10	100	50	40	5	0	1	0,1	0,2	0,02	6	5	25000
E7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	300	10	600	50	0	5	0,2	0,2	0,1	0,6	0,02	6	5	5000
E8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	300	10	600	100	0	0	0,2	1	0	0,6	0,08	6	5	5000
E9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	100	10	600	100	40	0	0	1	0,1	0,2	0,08	18	5	5000
E10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	300	2	600	100	40	5	0	0,2	0,1	0,6	0,02	18	15	5000
E11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	100	10	100	100	40	5	0,2	0,2	0	0,6	0,08	6	15	25000
E12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	300	2	600	50	40	5	0,2	1	0	0,2	0,08	18	5	25000
E13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	100	10	100	100	0	5	0,2	1	0,1	0,2	0,02	18	15	5000
E14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	100	2	600	50	40	0	0,2	1	0,1	0,6	0,02	6	15	25000
E15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	100	2	100	100	0	5	0	1	0,1	0,6	0,08	6	5	25000
E16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	100	2	100	50	40	0	0,2	0,2	0,1	0,6	0,08	18	5	5000
E17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	300	2	100	50	0	5	0	1	0	0,6	0,08	18	15	5000
E18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	300	10	100	50	0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,08	18	15	25000
E19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	100	10	600	50	0	0	0	1	0	0,6	0,02	18	15	25000
E20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	100	2	100	50	0	0	0	0,2	0	0,2	0,02	6	5	5000
E21 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	6	350	75	20	2,5	0,1	0,6	0,05	0,4	0,05	12	10	15000
E22 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	6	350	75	20	2,5	0,1	0,6	0,05	0,4	0,05	12	10	15000
E23 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	6	350	75	20	2,5	0,1	0,6	0,05	0,4	0,05	12	10	15000
E24 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	6	350	75	20	2,5	0,1	0,6	0,05	0,4	0,05	12	10	15000

Tabela 8: Matriz de ensaios definidos pela estratégia *Plackett e Burman* (PB 16) acrescidos de quatro pontos centrais (PC).

Ensaio	VALORES CODIFICADOS										VALORES REAIS (mg l ⁻¹)									
	Concentração inicial de microalgas	Ácido cítrico	Ureia	MgSO ₄ .7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂)H ₂ PO ₄	Salinidade	Concentração inicial de microalgas	Ácido cítrico	Ureia	MgSO ₄ .7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂)H ₂ PO ₄	Salinidade
E1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	300	0	50	0	0,4	0,4	0,06	1,0	10	5000
E2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	300	4	50	0	0	1	0,06	0,2	10	25000
E3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	300	4	150	0	0	0,4	0,14	0,2	2	25000
E4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	300	4	150	60	0	0,4	0,06	1,0	2	5000
E5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	100	4	150	60	0,4	0,4	0,06	0,2	10	5000
E6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	300	0	150	60	0,4	1	0,06	0,2	2	25000
E7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	100	4	50	60	0,4	1	0,14	0,2	2	5000
E8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	300	0	150	0	0,4	1	0,14	1,0	2	5000
E9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	300	4	50	60	0	1	0,14	1,0	10	5000
E10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	100	4	150	0	0,4	0,4	0,14	1,0	10	25000
E11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	100	0	150	60	0	1	0,06	1,0	10	25000
E12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	300	0	50	60	0,4	0,4	0,14	0,2	10	25000
E13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	100	4	50	0	0,4	1	0,06	1,0	2	25000
E14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	100	0	150	0	0	1	0,14	0,2	10	5000
E15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	100	0	50	60	0	0,4	0,14	1,0	2	25000
E16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	100	0	50	0	0	0,4	0,06	0,2	2	5000
E17 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	2	100	30	0,2	0,7	0,1	0,6	6	15000
E18 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	2	100	30	0,2	0,7	0,1	0,6	6	15000
E19 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	2	100	30	0,2	0,7	0,1	0,6	6	15000
E20 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	2	100	30	0,2	0,7	0,1	0,6	6	15000

Tabela 9: Matriz de ensaios definidos pela estratégia Fracionado 2⁽⁴⁻¹⁾ acrescidos de três pontos centrais (PC).

Ensaio	VALORES CODIFICADOS				VALORES REIAS (mg l ⁻¹)			
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂)H ₂ PO ₄	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂)H ₂ PO ₄
E1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	1
E2	1	-1	-1	1	0,6	0	0	6
E3	-1	1	-1	1	0	0,08	0	6
E4	1	1	-1	-1	0,6	0,08	0	1
E5	-1	-1	1	1	0	0	0,4	6
E6	1	-1	1	-1	0,6	0	0,4	1
E7	-1	1	1	-1	0	0,08	0,4	1
E8	1	1	1	1	0,6	0,08	0,4	6
E09 (PC)	0	0	0	0	0,3	0,04	0,2	3,5
E10 (PC)	0	0	0	0	0,3	0,04	0,2	3,5
E11 (PC)	0	0	0	0	0,3	0,04	0,2	3,5

Tabela 10: Ensaio definidos para a etapa de validação, onde o meio simplificado corresponde à compilação dos resultados dos três DOEs sequenciais.

Ensaio	Meio de Cultura	Valores Reais (mg l ⁻¹)													
		Concentração inicial de microalgas	Ácido cítrico	Ureia	MgSO ₄ .7H ₂ O	EDTA dissódico	H ₃ BO ₃	MnSO ₄ .H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O	(NH ₂)H ₂ PO ₄	Salinidade
E1	Controle	200	6	140	0,22	1	2,86	0,017	75	0,079	0,391	0,04	60	14	10000
E2	Controle	200	6	140	0,22	1	2,86	0,017	75	0,079	0,391	0,04	60	14	10000
E3	Controle	200	6	140	0,22	1	2,86	0,017	75	0,079	0,391	0,04	60	14	10000
E4	Simplificado	200	0	150	0	0	0	0	20	0	0	0	0	1	10000
E5	Simplificado	200	0	150	0	0	0	0	20	0	0	0	0	1	10000
E6	Simplificado	200	0	150	0	0	0	0	20	0	0	0	0	1	10000

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Primeiro DOE: Matriz de *Plackett e Burman* (PB 20)

Foram selecionadas quatorze variáveis do meio de cultura BG-11 para análise estatística visando à otimização do crescimento das microalgas, o acúmulo dos lipídeos e a redução dos custos do processo. Para este caso, a estratégia de DOE mais adequada foi a adoção da matriz de *Plackett e Burman* (PB 20) de vinte ensaios sendo adicionados os quatro pontos centrais. As amostras para a determinação da biomassa foram retiradas em quatro diferentes tempos (0, 24, 72 e 96 horas) e as análises foram realizadas em triplicata. A cada tempo de coleta, o volume coletado para análise era repostado com o mesmo meio de cultura. Para a determinação do teor lipídico, todo o volume restante de cada reator foi coletado ao final do experimento (96 h).

Os resultados de biomassa, teor e concentração lipídica estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de biomassa algácea, teor de lipídeos na biomassa seca e concentração lipídica por litro de cultivo em diferentes ensaios de acordo com a matriz de *Plackett e Burman* (PB 20).

Ensaio	Concentração inicial planejada de microalgas (g l ⁻¹)	Biomassa (g l ⁻¹) f(t) em horas				Lipídeos (%)	Concentração lipídica (g lipídeos l ⁻¹)
		0 h	24 h	72 h	96 h	96 h	
E1	0,3	0,2805	0,4425	0,8033	1,0703	3,18	0,03
E2	0,3	0,2737	0,3927	0,7403	0,7950	4,52	0,04
E3	0,1	0,1037	0,1853	0,3680	0,5203	7,67	0,04
E4	0,1	0,1097	0,2450	0,6650	0,8550	3,09	0,03
E5	0,3	0,2703	0,4473	0,9475	1,1137	4,04	0,05
E6	0,3	0,2560	0,4270	0,6467	0,6943	3,41	0,02
E7	0,3	0,2777	0,4180	0,9115	0,9682	3,64	0,04
E8	0,3	0,2425	0,4263	0,8240	0,9798	6,23	0,06
E9	0,1	0,1000	0,1125	0,4365	0,5443	4,17	0,02
E10	0,3	0,2905	0,3200	0,7070	0,9057	3,58	0,03
E11	0,1	0,1143	0,1387	0,3167	0,2967	4,02	0,02
E12	0,3	0,2553	0,2850	0,6273	0,6955	2,54	0,02
E13	0,1	0,0953	0,1307	0,3677	0,2153	2,96	0,01
E14	0,1	0,0847	0,1035	0,1847	0,4480	5,76	0,03
E15	0,1	0,1060	0,1000	0,1825	0,2357	7,51	0,02
E16	0,1	0,0963	0,1210	0,4117	0,5417	5,77	0,03
E17	0,3	0,3090	0,4220	0,8187	0,9017	8,10	0,07
E18	0,3	0,3127	0,4333	0,7580	0,7460	2,42	0,02
E19	0,1	0,4355	0,1767	0,3140	0,4113	2,33	0,01
E20	0,1	0,1147	0,2390	0,4650	0,4227	5,40	0,02
E21 (PC)	0,2	0,2040	0,2373	0,3945	0,4737	4,11	0,02
E22 (PC)	0,2	0,2160	0,2367	0,4453	0,7763	1,57	0,01
E23 (PC)	0,2	0,1910	0,1820	0,3823	0,6140	1,30	0,01
E24 (PC)	0,2	0,2150	0,2273	0,4280	0,6533	1,15	0,01

O teor lipídico é a porcentagem de óleo na biomassa seca e é uma medida bastante reportada na literatura para designar o percentual lipídico nas microalgas. A concentração lipídica é a quantidade de óleo por litro de cultivo e, nesse trabalho, foi utilizada como uma forma de avaliar as concentrações lipídicas de forma proporcional à quantidade final de biomassa (g l^{-1}) nos cultivos. Para obter o valor da concentração lipídica, multiplicou-se o teor lipídico pela concentração final de biomassa.

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam o crescimento das microalgas para o delineamento PB 20 realizado respectivamente com as concentrações iniciais de biomassa de 0,1, 0,2 e 0,3 g l^{-1} .

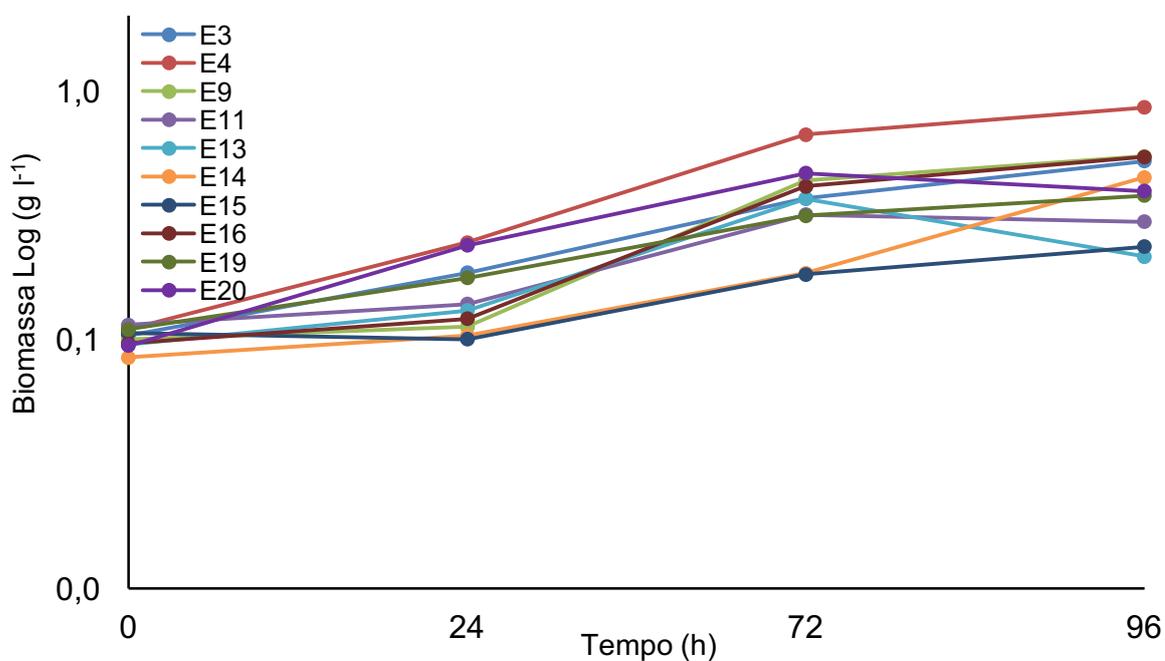


Figura 11: Concentração média de biomassa algácea em função do tempo para concentração inicial de biomassa de 0,1 g l^{-1} .

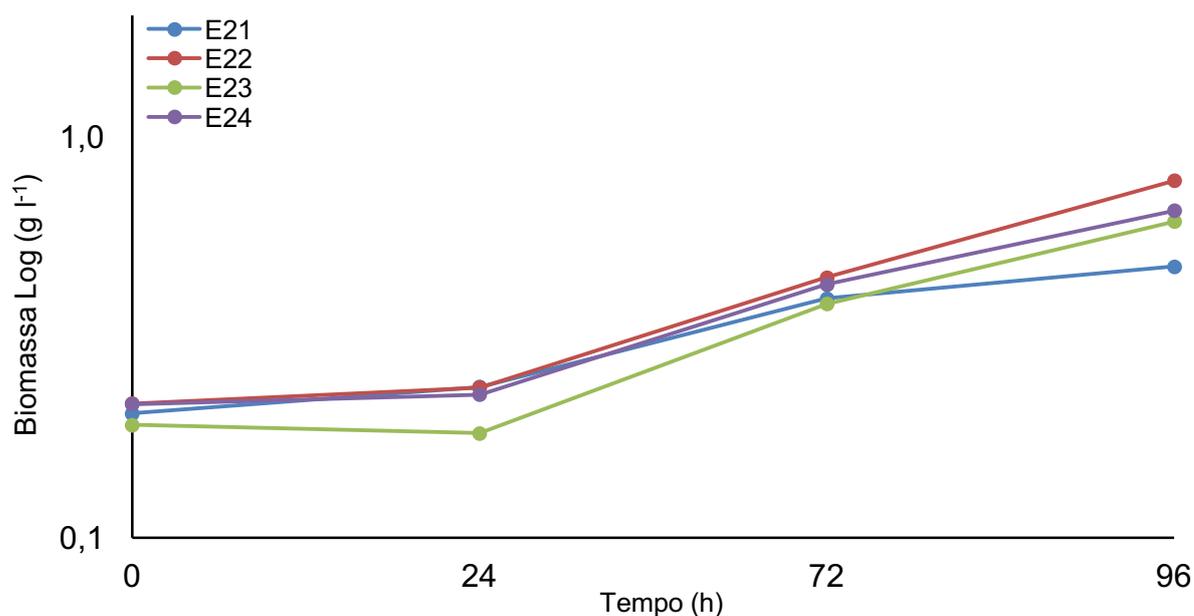


Figura 12: Resultados de concentração média de biomassa em função do tempo para concentração inicial de biomassa de 0,2 g l⁻¹.

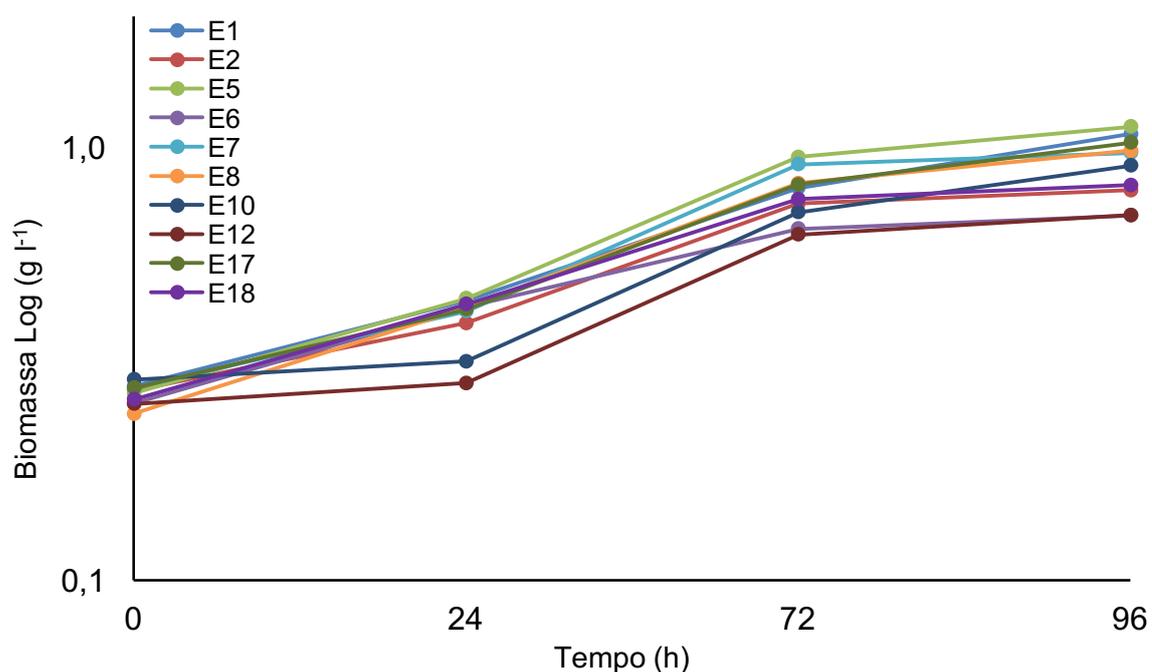


Figura 13: Resultados de concentração média de biomassa em função do tempo para concentração inicial de biomassa de 0,3 g l⁻¹.

A redução de alguns compostos no meio de cultura não ocasionou a morte das microalgas nos ensaios do delineamento PB 20. E, apesar da redução de compostos, o ensaio 5 apresentou o maior valor médio final de biomassa (1,1 g l⁻¹) e o ensaio 17 o maior valor médio de teor lipídico (8,1 %) e concentração lipídica

(7,3 g lipídeos l⁻¹). A retirada de alguns compostos e a redução de outros, sem ocasionar a morte das microalgas, indica que o meio de cultivo utilizado como padrão apresentava elementos em quantidade acima do essencial para o desenvolvimento celular.

Somente nos ensaios 7, 21, 22, 23 e 24 não houve redução de compostos no meio de cultura.

Observa-se que a maioria dos ensaios que iniciaram com 0,3 g l⁻¹ (nível superior) de concentração inicial de biomassa chegaram a valores finais mais altos de biomassa em relação aos ensaios que iniciaram com 0,1 e 0,2 g l⁻¹. O que é confirmado pela análise estatística dos efeitos das quatorze variáveis (Tabela 12), já que a única variável estatisticamente significativa e com efeito positivo foi a concentração inicial de microalgas.

O fato da concentração final de microalgas ser maior nos ensaios que iniciaram com 0,3 g l⁻¹ pode ser explicado pela dinâmica de uma curva de crescimento microbiano. Durante o desenvolvimento de um cultivo de microalgas em sistema fechado, os organismos se desenvolvem exponencialmente até esgotar os recursos, atingindo a fase estacionária. Uma maior concentração inicial de microalgas irá alcançar a fase estacionária mais rápido do que as que iniciaram como uma concentração menor. Dessa forma, quando se avalia a concentração final de microalgas em função do tempo, é de se esperar que nas condições ideais de cultivo os maiores aportes de biomassa alcançarão maiores valores finais de biomassa em um menor tempo. Essa hipótese é corroborada pela correlação ($R^2=0,62$) positiva entre concentração inicial de microalgas e biomassa final. É plausível a hipótese de que 96h de experimento não ter sido suficiente, para que todos os cultivos pudessem atingir a fase estacionária. Portanto, aqueles com concentrações iniciais mais baixas estariam em uma etapa de menor desenvolvimento populacional.

A Figura 14 apresenta os resultados do teor lipídico para o delineamento PB 20, realizado respectivamente com as concentrações iniciais de biomassa de 0,1, 0,2 e 0,3 g l⁻¹. Não foi observada uma correlação entre os fatores biomassa e teor lipídico.

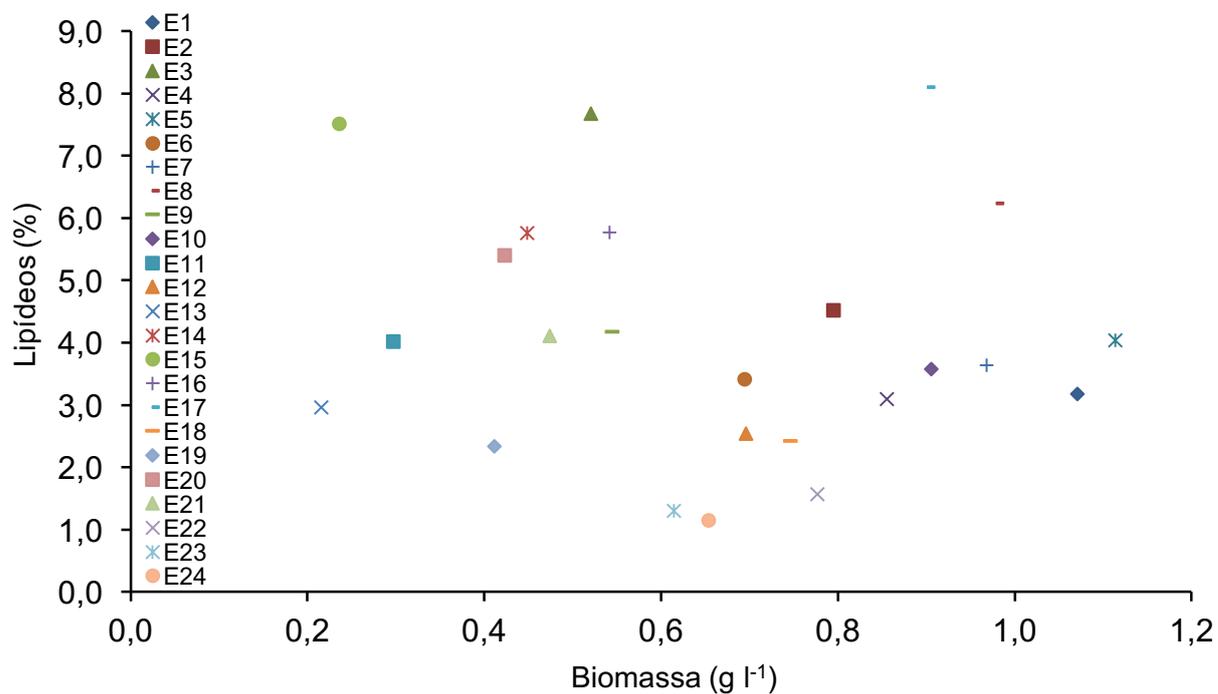


Figura 14: Teor de lipídeos em função da concentração de biomassa seca ao final de 96 horas para todos os ensaios do PB 20.

Tabela 12: Avaliação do efeito de diferentes variáveis, em três níveis, sobre a produção de biomassa, teor e concentração lipídica de acordo com a matriz de *Plackett e Burman* (PB 20) acrescidos de quatro pontos centrais.

Variável	Níveis (mg l ⁻¹)			Biomassa (g l ⁻¹) em f(t) em horas						Lipídeos (%)		Concentração lipídica (g lipídeos l ⁻¹) 96 h	
	-1	0	1	24 h		72 h		96 h		96 h		Efeito	p-valor
				Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor		
Média				0,28	< 0,0001	0,57	< 0,0001	0,67	< 0,0001	4,52	< 0,0001	2,95	< 0,0001
Curvatura				0,12	0,03	0,20	0,16	0,27	0,24	-6,35	0,01	-4,06	0,05
Concentração inicial de	100	200	300	0,25	< 0,0001	0,41	< 0,0001	0,46	< 0,0001	-0,70	0,33	1,62	0,04
Ácido cítrico	2	6	10	0,01	0,55	-0,01	0,82	-0,11	0,26	-0,76	0,29	-0,62	0,36
Ureia	100	350	600	-0,01	0,48	0,02	0,74	0,12	0,20	-0,60	0,40	0,19	0,77
MgSO ₄ .7H ₂ O	50	75	100	-0,01	0,77	0,05	0,40	0,05	0,56	-0,37	0,59	-0,04	0,96
EDTA dissódico	0	20	40	-0,05	0,03	-0,07	0,22	-0,04	0,68	0,06	0,93	-0,18	0,78
H ₃ BO ₃	0	2,5	5	-0,02	0,26	-0,03	0,63	-0,07	0,47	0,27	0,70	-0,22	0,74
MnSO ₄ .H ₂ O	0	0,1	0,2	-0,01	0,72	0,05	0,35	0,04	0,69	-0,94	0,20	-0,33	0,61
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,6	1	-0,03	0,14	-0,08	0,18	-0,08	0,37	0,38	0,59	0,15	0,82
CuSO ₄ .5H ₂ O	0	0,05	0,1	-0,03	0,09	-0,07	0,25	-0,06	0,51	-0,55	0,43	-0,96	0,17
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2	0,4	0,6	-0,03	0,11	-0,07	0,25	-0,03	0,70	1,26	0,10	0,77	0,26
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02	0,05	0,08	-0,02	0,24	-0,04	0,48	0,00	0,96	1,29	0,09	0,64	0,34
FeCl ₃ .6H ₂ O	6	12	18	-0,03	0,15	0,02	0,73	0,00	0,96	-1,14	0,13	-0,44	0,50
(NH ₂) ₂ H ₂ PO ₄	5	10	15	0,00	0,86	-0,03	0,57	0,01	0,93	-0,22	0,75	0,02	0,98
Salinidade	5000	15000	25000	-0,01	0,68	-0,10	0,10	-0,09	0,33	-1,28	0,10	-1,49	0,05

Observação: Em negrito p valor ≤ 0,10 (estatisticamente significativo a 90% de confiança).

A avaliação do efeito das quatorze variáveis sobre a produção de biomassa, teor e concentração lipídica (Tabela 11) indica que o aumento da concentração de EDTA acarreta em uma diminuição da biomassa no tempo de 24 horas e não é estatisticamente significativo para biomassa nos tempos de 72 e 96 horas, teor e concentração lipídica. O aumento da

concentração de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ acarreta em uma diminuição da biomassa no tempo 24 horas e não é estatisticamente significativo para biomassa (72 e 96h), teor e concentração lipídica. O aumento da concentração de molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e de cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) promoveu acréscimo do teor lipídico e não foi estatisticamente significativo para a concentração de biomassa e concentração lipídica. O aumento da salinidade apresentou efeito negativo acarretando em uma diminuição da biomassa no tempo de 72 horas e uma diminuição do teor e concentração lipídica.

As demais variáveis não foram estatisticamente significativas para a concentração de biomassa, teor e concentração lipídica dentro da faixa de concentração estudada. A Tabela 13 apresenta a interpretação dos resultados estatísticos da estratégia de planejamento PB 20 e a definição das faixas de estudo (níveis) para a estratégia de DOE subsequente.

Tabela 13: Definição da próxima estratégia de DOE a partir da interpretação dos resultados estatísticos do efeito de diferentes variáveis, em três níveis, sobre a produção de biomassa, teor de lipídeos e concentração lipídica de acordo com a matriz de *Plackett e Burman* (PB 20).

Variáveis	Avaliação dos resultados estatísticos dos efeitos	Condições para próximo DOE
Concentração inicial de microalgas	O aumento da concentração inicial de microalgas acarreta em um aumento da biomassa e concentração lipídica. Não é estatisticamente significativo para lipídeos.	Manter o estudo na faixa de 100 a 300 mg l ⁻¹
Ácido cítrico	O aumento da concentração de ácido cítrico não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 0 a 4 mg l ⁻¹
Ureia	O aumento da concentração de ureia não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 50 a 150 mg l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	O aumento da concentração de MgSO ₄ .7H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 0 a 60 mg l ⁻¹
EDTA dissódico	O aumento da concentração de EDTA acarreta em uma diminuição da biomassa (24h) e não é estatisticamente significativo para biomassa (72 e 96h), lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
H ₃ BO ₃	O aumento da concentração de H ₃ BO ₃ não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
MnSO ₄ .H ₂ O	O aumento da concentração de MnSO ₄ .H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
ZnSO ₄ .7H ₂ O	O aumento da concentração de ZnSO ₄ .7H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 0 a 0,4 mg l ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	O aumento da concentração de CuSO ₄ .5H ₂ O acarreta em uma diminuição da biomassa (24h) e não é estatisticamente significativo para biomassa (72 e 96h), lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	O aumento da concentração de Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa e concentração lipídica, mas acarreta em um aumento em lipídeos (%).	Estudar de 0,4 a 1,0 mg l ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	O aumento da concentração de CoCl ₂ .6H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa e concentração lipídica, mas acarreta em um aumento dos lipídeos (%).	Estudar de 0,06 a 0,14 mg l ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	O aumento da concentração de FeCl ₃ .6H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 0,2 a 1 mg l ⁻¹
(NH ₂) ₂ H ₂ PO ₄	O aumento da concentração de (NH ₂) ₂ H ₂ PO ₄ não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 2 a 10 mg l ⁻¹
Salinidade	O aumento da salinidade acarreta em uma diminuição de biomassa (72h), lipídeos e concentração lipídica.	Manter o estudo na faixa de 5 a 25 mg l ⁻¹

6.2 Segundo DOE: Matriz de *Plackett e Burman* (PB 16)

A partir da análise estatística das quatorze variáveis no primeiro delineamento PB 20 (Tabela 7), foi possível eliminar quatro variáveis do meio de cultivo (EDTA dissódico, H_3BO_3 , $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$). As outras dez variáveis foram estudadas através de um delineamento (PB 16) com 16 ensaios acrescidos de quatro pontos centrais. A Tabela 8 apresenta as variáveis estudadas e seus níveis (faixas de concentração).

Os resultados de concentração de biomassa, teor e concentração lipídica do delineamento PB 16 estão apresentados na Tabela 14 a seguir.

Tabela 14: Valores de biomassa algácea, teor de lipídeos na biomassa seca e concentração lipídica por litro de cultivo em diferentes ensaios de acordo com a matriz de *Plackett e Burman* (PB 16).

Ensaio	Concentração inicial planejada de microalgas ($g\ l^{-1}$)	Biomassa ($g\ l^{-1}$) f(t) em horas				Lipídeos (%)	Concentração lipídica ($g\ lipídeos\ l^{-1}$)
		0 h	24 h	72 h	96 h	96 h	96 h
E1	0,3	0,3177	0,4137	0,5327	0,5050	4,21	0,02
E2	0,3	0,3010	0,3160	0,3660	0,3097	7,14	0,02
E3	0,3	0,2837	0,3530	0,5023	0,5417	5,22	0,03
E4	0,3	0,3107	0,4387	0,7257	0,8503	2,03	0,02
E5	0,1	0,1267	0,1937	0,3893	0,4490	2,64	0,01
E6	0,3	0,3040	0,3623	0,4820	0,6040	3,32	0,02
E7	0,1	0,1357	0,2020	0,3960	0,4367	2,64	0,01
E8	0,3	0,3070	0,3950	0,7320	0,9143	2,69	0,02
E9	0,3	0,3087	0,4163	0,7087	0,8203	1,27	0,01
E10	0,1	0,1150	0,1227	0,1490	0,1513	8,42	0,01
E11	0,1	0,1260	0,1397	0,1780	0,2040	6,61	0,01
E12	0,3	0,3010	0,3253	0,4777	0,4943	3,10	0,02
E13	0,1	0,1223	0,1367	0,1537	0,1493	10,23	0,02
E14	0,1	0,1197	0,1453	0,1643	0,1657	13,39	0,02
E15	0,1	0,1340	0,1800	0,2917	0,3327	2,76	0,01
E16	0,1	0,1307	0,2233	0,4553	0,5313	4,65	0,02
E17	0,2	0,2203	0,2550	0,6117	0,5823	2,95	0,02
E18	0,2	0,2013	0,3754	0,5397	0,5060	3,62	0,02
E19	0,2	0,2307	0,3420	0,5787	0,6163	1,96	0,01
E20	0,2	0,2320	0,3317	0,5800	0,6373	2,22	0,01

As Figuras 15, 16 e 17 apresentam os resultados de crescimento das microalgas para o delineamento PB 16 realizado respectivamente com as concentrações iniciais de biomassa de 0,1, 0,2 e 0,3 g l⁻¹.

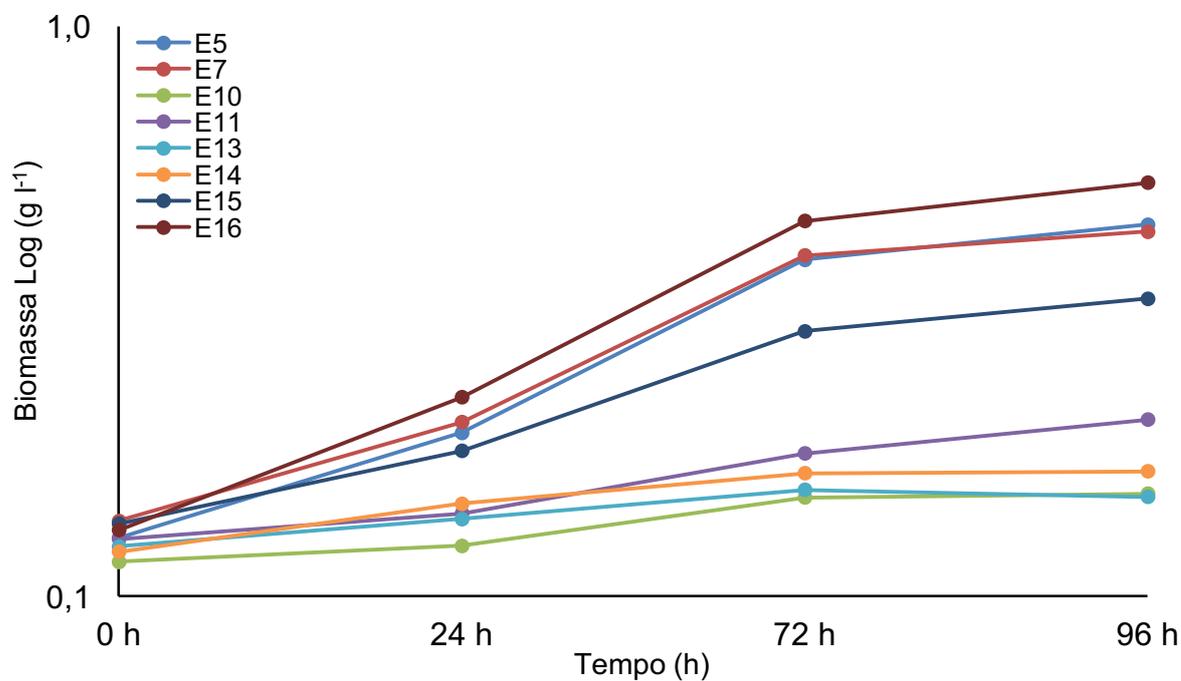


Figura 15: Concentração média de biomassa algácea em função do tempo para concentração inicial de biomassa de 0,1 g l⁻¹.

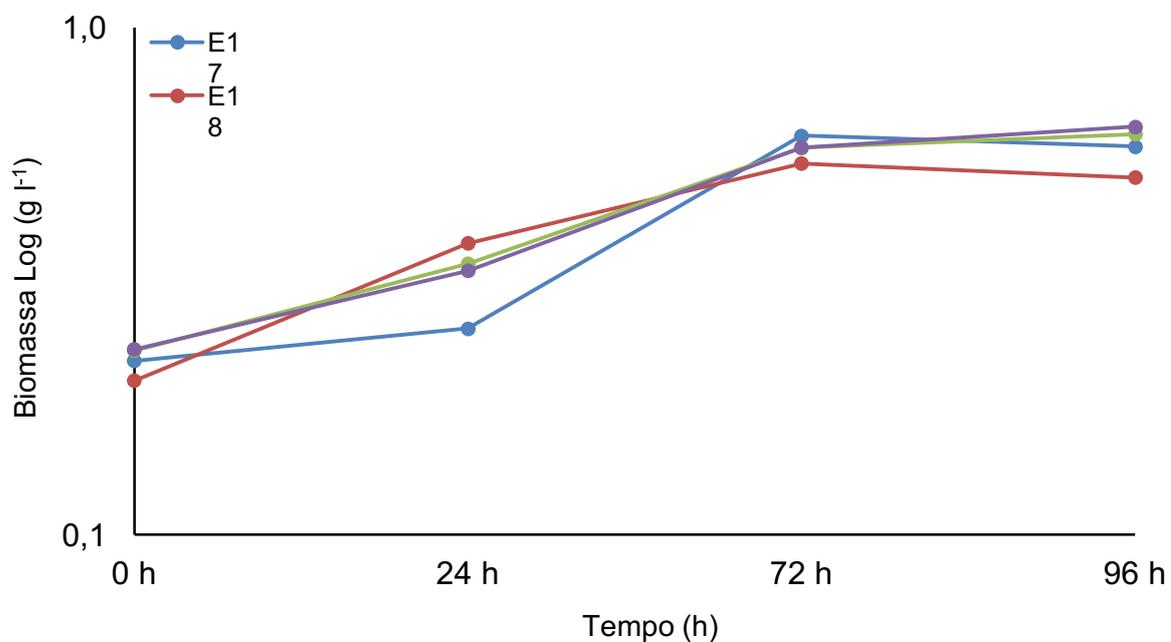


Figura 16: Concentração média de biomassa algácea em função do tempo para concentração inicial de biomassa de 0,2 g l⁻¹.

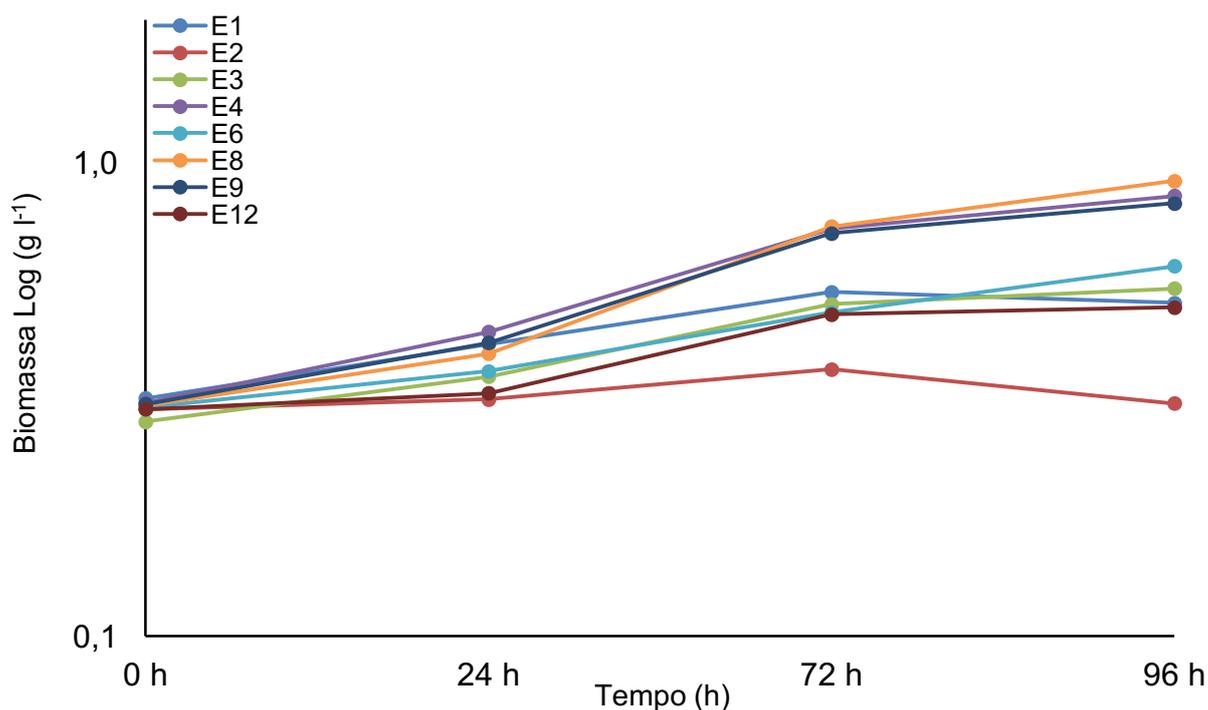


Figura 17: Concentração média de biomassa algácea em função do tempo para concentração inicial de biomassa de $0,3 \text{ g l}^{-1}$.

Assim como observado nos ensaios do PB 20, a maioria dos ensaios do PB 16 que utilizaram $0,3 \text{ g l}^{-1}$ (nível superior) como concentração inicial de biomassa chegaram a valores finais mais altos de biomassa. O que é confirmado pela análise estatística dos efeitos das quatorze variáveis (Tabela 15). De forma análoga ao observado e discutido no PB 20, esse comportamento pode ser explicado pela dinâmica da curva de crescimento microbiano,

De acordo com a concentração inicial de microalgas, a biomassa, em quatro dias de cultivo, variou de $0,1493$ a $0,9143 \text{ g l}^{-1}$, nos ensaios E13 e E8 respectivamente.

Os ensaios 4 e 8 apresentaram os maiores valores de biomassa e concentração lipídica. Para o alcance da competitividade na produção de produtos energéticos, como o biodiesel, é necessário obter uma alta produtividade em massa e óleo. Apesar dos valores mais altos de biomassa e concentração lipídica nos ensaios supracitados, os valores obtidos ainda são inferiores aos necessários para o alcance de uma produção competitiva de biodiesel

Os resultados dos teores e concentrações lipídicas para o delineamento PB 16, realizado com três concentrações iniciais de biomassa, são apresentados nas Figuras 18 e 19.

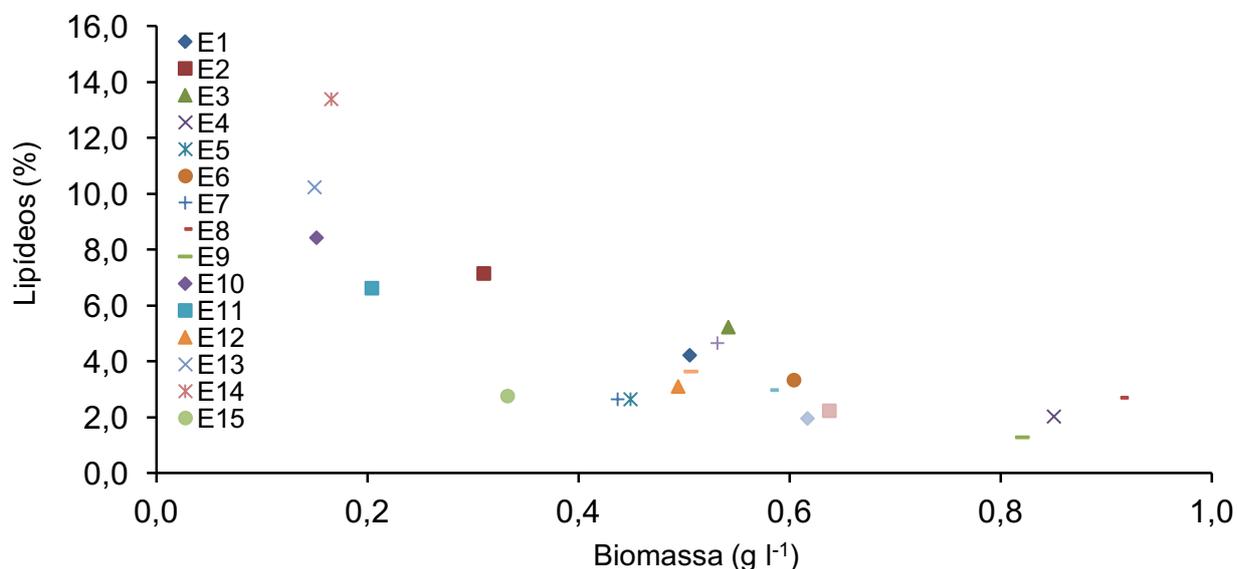


Figura 18: Teor de lipídeos em função da concentração de biomassa seca ao final de 96 horas para todos os ensaios do PB 16.

Foi observada uma forte correlação negativa (correlação de pearson $-0,77$ / $p < 0,0001$) entre teor lipídico e biomassa final (Figura 18). Esse dado condiz com outros dois indicadores. O primeiro é a correlação positiva entre a concentração inicial e final de biomassa (Tabela 14). O segundo é a correlação negativa observada entre o teor lipídico e a concentração inicial de biomassa (Tabela 15). A dinâmica entre os teores lipídicos e as concentrações iniciais e finais de biomassa, também se explica pela curva de crescimento microbiano. Os cultivos com maior concentração inicial de biomassa alcançam a fase estacionária mais rápido do que as que iniciaram como uma concentração menor. Assim, ao final das 96 horas elas apresentam uma maior biomassa final. No entanto, para suportar esse crescimento, as microalgas provavelmente utilizam as reservas lipídicas como fonte energética, promovendo os menores teores intracelulares de lipídeos.

A Tabela 15 apresenta os resultados da análise estatística para avaliação do efeito de diferentes variáveis sobre a produção de biomassa, teor e concentração lipídica de acordo com a matriz de ensaios de *Plackett e Burman* (PB 16).

Tabela 15: Avaliação do efeito de diferentes variáveis, em três níveis, sobre a produção de biomassa, teor e concentração lipídica de acordo com a matriz de *Plackett e Burman* (PB 16) acrescidos de quatro pontos centrais.

Variável	Níveis (mg l ⁻¹)			Biomassa (g l ⁻¹) em ft tempo (horas)								Lipídeos (%)		Concentração lipídica (g lipídeos l ⁻¹)	
	-1	0	1	0 h		24 h		72 h		96 h		96 h			
				Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média				0,22	< 0,0001	0,27	< 0,0001	0,42	< 0,0001	0,47	< 0,0001	5,02	< 0,0001	0,0175	< 0,0001
Curvatura				0,01	0,2960	0,11	0,0204	0,32	0,0027	0,24	0,0786	-4,67	0,0772	-0,0042	0,1171
Concentração inicial de microalgas	100	200	300	0,18	< 0,0001	0,21	< 0,0001	0,29	< 0,0001	0,33	0,0003	-2,80	0,0264	0,0048	0,0020
Ácido cítrico	0	2	4	0,00	0,3606	0,00	0,9669	0,01	0,7783	-0,01	0,9216	-0,14	0,8933	-0,0027	0,0363
Ureia	50	100	150	-0,01	0,1581	-0,01	0,6465	-0,01	0,8290	0,04	0,4973	1,04	0,3419	0,0026	0,0412
MgSO ₄ .7H ₂ O	0	30	60	0,01	0,2216	0,02	0,2825	0,07	0,0550	0,12	0,0609	-3,95	0,0050	-0,0078	0,0001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0	0,2	0,4	0,00	0,6994	-0,01	0,6568	-0,01	0,7709	-0,01	0,9059	-0,73	0,4998	-0,0019	0,1156
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,4	0,7	1	0,00	0,8971	-0,02	0,3304	-0,04	0,2307	-0,03	0,5687	1,78	0,1216	-0,0001	0,9130
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,06	0,1	0,1	0,00	0,3863	-0,01	0,5414	0,02	0,6133	0,03	0,5647	-0,17	0,8748	-0,0015	0,2036
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,2	0,6	1	0,00	0,3284	0,02	0,3844	0,03	0,3937	0,05	0,3781	-0,49	0,6501	-0,0040	0,0057
(NH ₂) ₂ PO ₄	2	6	10	0,00	0,7505	-0,03	0,1373	-0,10	0,0192	-0,16	0,0176	1,66	0,1465	-0,0027	0,0352
Salinidade	5000	15000	25000	-0,01	0,1000	-0,06	0,0058	-0,19	0,0005	-0,24	0,0021	1,66	0,1455	-0,0009	0,4114

Observação: Em negrito p valor ≤ 0,10 (estatisticamente significativo a 90% de confiança).

Conforme os resultados estatísticos, na faixa de concentração estudada, o aumento da concentração inicial de biomassa acarretou em um aumento na concentração final de microalgas e na concentração lipídica e uma diminuição no teor lipídico.

O aumento da concentração de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) não foi estatisticamente significativo para a concentração de biomassa e teor lipídico e indicou uma redução na concentração lipídica; o aumento da concentração de ureia (CH_4N_2O) não foi estatisticamente significativo para a concentração de biomassa e lipídeos mas, acarreta em um aumento na concentração lipídica; o aumento da concentração do magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) aumentou a concentração de biomassa (3° e 4° dia), diminuiu o teor e concentração lipídica; o aumento da concentração de ferro ($FeCl_3.6H_2O$) não foi estatisticamente significativo para concentração de biomassa e teor lipídico, mas acarreta em uma diminuição na concentração lipídica; o aumento da concentração de fosfato de monoamônio ($NH_4H_2PO_4$) diminuiu a concentração de biomassa (3° e 4° dia) e concentração lipídica e não é estatisticamente significativo para o teor lipídico; o aumento da salinidade diminuiu a concentração de biomassa e não foi estatisticamente significativo para teor e concentração lipídica.

As demais variáveis não foram estatisticamente significativas para a concentração de biomassa, teor e concentração lipídica dentro da faixa de concentração estudada. A Tabela 16 apresenta a interpretação dos resultados estatísticos da estratégia de planejamento PB 16 e a definição das faixas de estudo (níveis) para a estratégia de DOE subsequente.

Tabela 16: Definição da próxima estratégia de DOE a partir da interpretação dos resultados estatísticos do efeito de diferentes variáveis, em três níveis, sobre a produção de biomassa, acúmulo de lipídeos e concentração lipídica de acordo com a matriz de *Plackett e Burman* (PB 16).

Variáveis	Avaliação dos resultados estatísticos dos efeitos	Condições para próximo DOE
Concentração inicial de microalgas	O aumento da concentração inicial de microalgas acarreta em um aumento da concentração final de microalgas, uma diminuição de lipídeos e um aumento da concentração lipídica.	Fixar em 200 mg l ⁻¹
Ácido Cítrico	O aumento da concentração de ácido cítrico não é estatisticamente significativo para biomassa e lipídeos e diminui a concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
Ureia	O aumento da concentração de ureia não é estatisticamente significativo para biomassa e lipídeos e aumenta a concentração lipídica.	Fixar em 150 mg l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	O aumento da concentração de MgSO ₄ .7H ₂ O acarreta em um aumento da biomassa (72 e 96 h) e diminuição de lipídeos e concentração lipídica.	Fixar em 20 mg l ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	O aumento da concentração de ZnSO ₄ .7H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	O aumento da concentração de Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 0 a 0,6 mg l ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	O aumento da concentração de CoCl ₂ .6H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Estudar de 0 a 0,8 mg l ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	O aumento da concentração de FeCl ₃ .6H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa e lipídeos e diminui a concentração lipídica.	Estudar de 0 a 0,4 mg l ⁻¹
(NH ₂)H ₂ PO ₄	O aumento da concentração de (NH ₂)H ₂ PO ₄ acarreta em uma diminuição da biomassa (72 e 96 h) e concentração lipídica. Não é estatisticamente significativo para lipídeos	Estudar de 1 a 6 mg l ⁻¹
Salinidade	O aumento da salinidade acarreta em uma diminuição da biomassa e não é estatisticamente significativo para lipídeos e concentração lipídica.	Fixar em 10 g l ⁻¹

6.3 Terceiro DOE: (Fracionado $2^{(4-1)}$)

Após a realização do 2º DOE foi possível fixar seis variáveis, com concentrações definidas, do meio de cultivo e quatro variáveis foram mantidas para o estudo em outras faixas de valores. Dessa forma, um DOE fracionado $2^{(4-1)}$ acrescido dos pontos centrais (três) foi realizado. A Tabela 17 apresenta as faixas de estudo (concentrações) do DOE fracionado $2^{(4-1)}$. A Tabela 18 apresenta os resultados de biomassa e os teores de lipídeos.

Tabela 17: Valores dos níveis das variáveis estudadas no DOE Fracionado $2^{(4-1)}$

Variáveis	Níveis (mg l^{-1})		
	-1	0	1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0	0,3	0,6
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0	0,04	0,08
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0	0,2	0,4
$(\text{NH}_2)\text{H}_2\text{PO}_4$	1	3,5	6

Tabela 18: Valores de biomassa algácea, teor de lipídeos na biomassa seca e concentração lipídica por litro de cultivo em diferentes ensaios de acordo com a matriz do Fracionado $2^{(4-1)}$

Ensaio	Concentração inicial planejada de microalgas (g l^{-1})	Biomassa (g l^{-1}) f(t) horas				Lipídeos (%)	Concentração lipídica (g lipídeos l^{-1})
		0 h	24 h	72 h	96 h	96 h	96 h
E1	0,2	0,2513	0,2930	0,4750	0,5053	6,00	0,03
E2	0,2	0,2303	0,2720	0,4420	0,4987	3,34	0,02
E3	0,2	0,2527	0,2750	0,3853	0,4290	3,96	0,02
E4	0,2	0,2507	0,2935	0,4460	0,5163	6,43	0,03
E5	0,2	0,2480	0,2863	0,3450	0,3707	5,31	0,02
E6	0,2	0,2377	0,3027	0,4620	0,5150	4,82	0,02
E7	0,2	0,2467	0,2873	0,4553	0,5190	3,85	0,02
E8	0,2	0,2457	0,2857	0,3300	0,3673	7,05	0,03
E9	0,2	0,2510	0,2850	0,3890	0,4527	5,46	0,02
E10	0,2	0,2527	0,2983	0,4563	0,5077	4,62	0,02
E11	0,2	0,2497	0,3090	0,4450	0,4923	4,21	0,02

No delineamento Fracionado $2^{(4-1)}$ todos os ensaios iniciaram com a mesma concentração inicial de microalgas. Dependendo do tipo de formulação de cada ensaio foi observado o valor mínimo de biomassa igual a $0,3673 \text{ g l}^{-1}$ (ensaio 8) e valor máximo de biomassa igual a $0,5190 \text{ g l}^{-1}$ (ensaio 7).

A Figura 19 apresenta o crescimento das microalgas ao longo dos quatro dias de cultivo para os ensaios do delineamento Fracionado $2^{(4-1)}$.

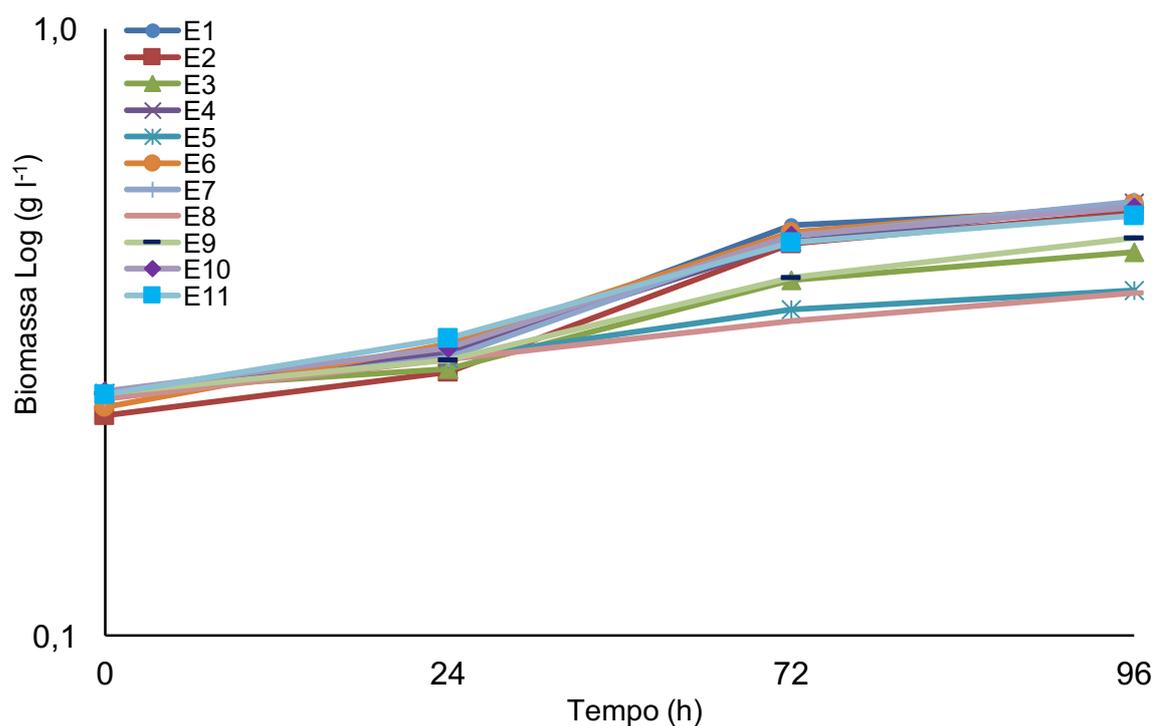


Figura 19: Concentração média de biomassa algácea em função do tempo.

A Tabela 19 apresenta os resultados da análise estatística dos ensaios do Fracionado $2^{(4-1)}$. O aumento da concentração da variável fosfato de monoamônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) diminuiu a concentração de biomassa e não foi estatisticamente significativa para o teor e concentração lipídica. A redução da biomassa como resultado do aumento da concentração de fósforo (concentrações superiores a $0,34\text{Mm}$ de fósforo) foi também observado em um estudo de otimização de meio de cultura para *Scenedesmus* sp. (XIA et al., 2013).

A composição do meio de cultura estudada no fracionado $2^{(4-1)}$ é bastante simplificada. A retirada de alguns micronutrientes, ao longo dos delineamentos, como o zinco, o cobre, manganês pode ter influenciado de forma negativa na dinâmica da absorção do nutriente fósforo, já que o principal papel dos micronutrientes é o de participar na estrutura e atividade das enzimas, responsáveis pelo funcionamento de diversas vias metabólicas (LOURENÇO, 2006).

O aumento das demais variáveis não foi significativo para biomassa, teor e concentração lipídica.

A Tabela 20 apresenta a interpretação dos resultados estatísticos da estratégia de planejamento Fracionado $2^{(4-1)}$ e a definição das faixas de estudo (níveis) para a validação do estudo.

Tabela 19: Avaliação do efeito de diferentes variáveis, em três níveis, sobre a produção de biomassa, acúmulo de lipídeos e concentração lipídica de acordo com a matriz do Fracionado 2⁽⁴⁻¹⁾ acrescidos de três pontos centrais.

Variáveis	Níveis (mg l ⁻¹)			Biomassa (g l ⁻¹) f(t) em horas						Lipídeos (%)		Concentração lipídica (g lipídeos l ⁻¹)	
	-1	0	1	24 h		72 h		96 h		96 h		96 h	
				Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média				0,287	< 0,0001	0,418	< 0,0001	0,465	< 0,0001	5,095	0,0002	0,023	0,0001
Curvatura				0,021	0,1556	0,025	0,6171	0,038	0,5160	-0,663	0,7607	-0,001	0,8973
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0	0,3	0,6	0,003	0,6627	0,005	0,8518	0,018	0,5483	0,630	0,5839	0,003	0,3975
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	0,04	0,08	-0,003	0,6543	-0,027	0,3246	-0,014	0,6325	0,455	0,6902	0,001	0,7678
FeCl ₃ .6H ₂ O	0	0,2	0,4	0,007	0,3275	-0,039	0,1733	-0,044	0,1805	0,325	0,7750	-0,002	0,6642
(NH ₂)H ₂ PO ₄	1	3,5	6	-0,014	0,0802	-0,084	0,0189	-0,097	0,0188	-0,360	0,7517	-0,007	0,1048

Observação: Em negrito p valor ≤ 0,10 (estatisticamente significativo a 90% de confiança).

Tabela 20: Definição da etapa de validação a partir da interpretação dos resultados estatísticos do efeito de diferentes variáveis, em três níveis, sobre a produção de biomassa, acúmulo de lipídeos e concentração lipídica de acordo com a matriz do Fracionado 2⁽⁴⁻¹⁾. A etapa de validação será constituída pela compilação dos resultados dos três DOEs.

Variável	Avaliação do resultado estatístico dos efeitos	Condições para a validação
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	O aumento da concentração de Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
CoCl ₂ .6H ₂ O	O aumento da concentração de CoCl ₂ 6H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
FeCl ₃ .6H ₂ O	O aumento da concentração de FeCl ₂ 6H ₂ O não é estatisticamente significativo para biomassa, lipídeos e concentração lipídica.	Retirar do meio de cultura
(NH ₂)H ₂ PO ₄	O aumento da concentração de (NH ₂)H ₂ PO ₄ acarreta em uma diminuição da concentração de biomassa e não é estatisticamente significativo para lipídeos e concentração lipídica.	Fixar em 1 mg l ⁻¹

6.4 Validação dos Resultados

Ao final dos três delineamentos foi definida a composição de um meio de cultura simplificado que apresentou as melhores condições para a concentração de biomassa e concentração lipídica para a microalga da classe Trebouxiophyceae.

O meio de cultura simplificado apresenta uma composição mais simples em termos de nutrientes e conseqüentemente mais econômica. A redução de compostos contribui também para a sustentabilidade dos cultivos em larga escala, uma vez que, a demanda por esses nutrientes será reduzida. Adicionalmente, cultivos com excesso de nutrientes podem ocasionar impactos ambientais significativos relacionados à eutrofização dos corpos hídricos, através do descarte de efluente não tratado (ABDEL-RAOUF, 2012; CLARENS et al., 2009; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011)

A composição do meio simplificado, por ser bastante simples, tem potencial para utilização somente na etapa final do cultivo, com o objetivo de ocasionar um estresse pela limitação nutricional. No meio simplificado todos os micronutrientes foram retirados. Ainda assim, foi observado crescimento em todos os ensaios. Provavelmente, as microalgas possuíam reservas de micronutrientes para suportar o seu desenvolvimento, já que, o crescimento das microalgas não depende somente dos macronutrientes essenciais (carbono, nitrogênio e fósforo). Íons como Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e Cl^- e micronutrientes como o ferro, zinco, manganês, cobalto, cobre e molibdênio são essenciais para as funções metabólicas (SUNDA WG, PRICE NM, 2005). Assim, o meio simplificado se mostrou eficiente para a etapa final de cultivo. Entretanto, não seria adequado para a geração do inóculo inicial de microalgas, pois este processo demanda um meio mais rico.

A razão nitrogênio e fósforo é considerada fator chave para o controle do conteúdo lipídico nas microalgas. Contudo, não há consenso sobre a razão nitrogênio e fósforo ideal para o aumento do teor lipídico sem comprometer a produtividade de biomassa algácea (CHU et al., 2014; RASHID et al., 2014; XIN et al., 2010).

A Tabela 21 apresenta a evolução das variáveis ao longo dos três delineamentos até a obtenção da composição do meio de cultura simplificado para a microalga pertencente à classe Trebouxiophyceae.

Tabela 21: Concentrações das variáveis ao longo dos delineamentos sequenciais para a obtenção da composição do meio simplificado. O meio controle corresponde a uma composição já utilizada em experimentos da planta piloto e foi utilizado na etapa de validação do meio simplificado.

Variáveis	PB 20 (mg l ⁻¹)			PB 16 (mg l ⁻¹)			Fracionado 2 ⁽⁴⁻¹⁾ (mg l ⁻¹)			Controle (mg l ⁻¹)	Meio Simplificado (mg l ⁻¹)
	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1		
Concentração inicial de microalgas	100	200	300	100	200	300	200	200	200	–	200
Ácido cítrico	2	6	10	0	2	4	0	0	0	6	0
Ureia	100	350	600	50	100	150	150	150	150	140	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	50	75	100	0	30	60	20	20	20	75	20
EDTA dissódico	0	20	40	0	0	0	0	0	0	1	0
H ₃ BO ₃	0	2,5	5	0	0	0	0	0	0	2,86	0
MnSO ₄ .H ₂ O	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0	0	0,017	0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,6	1	0	0,2	0,4	0	0	0	0,22	0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0	0,05	0,1	0	0	0	0	0	0	0,079	0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2	0,4	0,6	0,4	0,7	1	0	0,3	0,6	0,391	0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02	0,05	0,08	0,06	0,1	0,14	0	0,04	0,08	0,04	0
FeCl ₃ .6H ₂ O	6	12	18	0,2	0,6	1	0	0,2	0,4	60	0
(NH ₄)H ₂ PO ₄	5	10	15	2	6	10	1	3,5	6	14	1
Salinidade	5000	5000	10000	5000	15000	25000	10000	10000	10000	10000	10000

Os ensaios controle correspondem à formulação de meio de cultura definida pela equipe da PETROBRAS como sendo adequada para crescimento e teor lipídico, em cultivos de microalga em uma escala piloto.

A Figura 20 apresenta os valores médios de biomassa para os meios simplificado e controle ao longo de quinze dias.

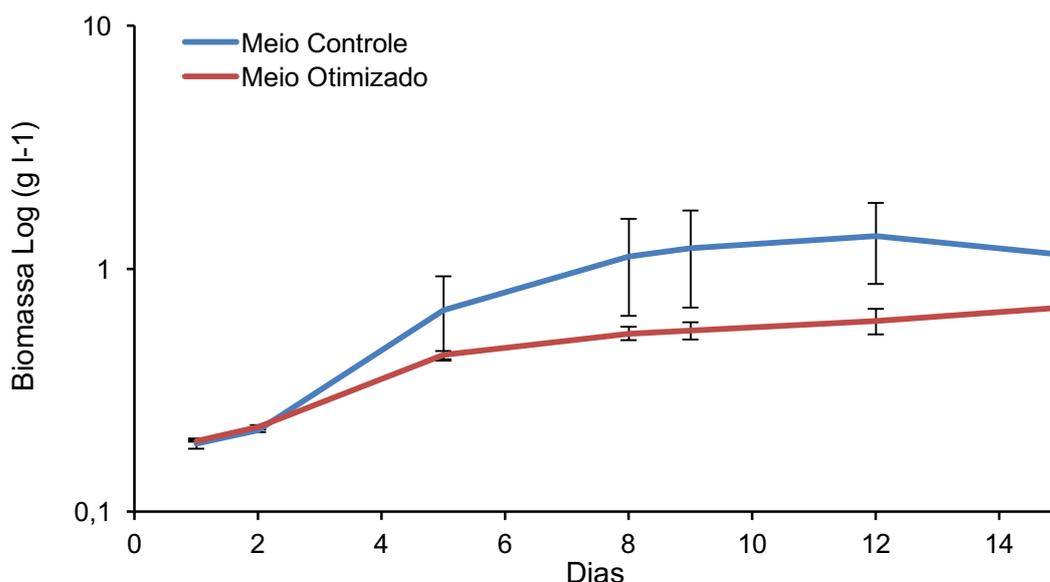


Figura 20: Valores de biomassa (média \pm desvio padrão) para os meios simplificado e controle ao longo de quinze dias.

Para avaliar o efeito do meio cultura sobre o crescimento da microalga ao longo do tempo foi utilizado uma análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA). O resultado da análise indicou diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) tanto para o fator meio de cultura quanto para o fator tempo. O meio de cultura controle apresentou crescimento superior em relação ao meio simplificado. Ao final de quinze dias foi observado no meio simplificado valores médios de concentração de biomassa de $0,69 \text{ g l}^{-1}$ e no meio de cultura controle de $1,14 \text{ g l}^{-1}$.

A dificuldade em manter as mesmas condições de luminosidade (em decorrência da posição dos frascos no painel e luz), agitação e mistura de ar/ CO_2 pode ser uma explicação para a variação nos resultados dos ensaios dos diferentes meios de cultura, inclusive dos ensaios referentes aos pontos centrais.

A Figura 21 apresenta a média dos valores de biomassa e lipídeos na etapa de validação. O teor lipídico foi maior na condição do meio simplificado em comparação ao controle, apresentando médias de 1,76% contra 0,98%. Essa

diferença foi estatisticamente significativa considerando o valor de $p \leq 0,10$ porém o mesmo não se observa ao considerar um valor de significância mais rígido como o de $p \leq 0,05$. É importante ressaltar, que em estudos biológicos a utilização de um valor de significância mais abrangente (ex.0,10) é aceitável, uma vez que em sistemas biológicos, existem muitas variáveis diferentes, que por sua vez, nem sempre podem ser controladas (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Adicionalmente, o presente experimento contou com apenas três repetições, o que demanda diferenças muito acentuadas para atingir valores de significância baixos.

Apesar do cultivo da microalga da classe Trebouxiophyceae com o meio simplificado apresentar um aumento do teor lipídico em comparação ao controle, este teor é baixo não apresentou potencial para aplicação principal na produção de óleos para produção de energia. O valor máximo obtido do teor lipídico está muito aquém dos níveis de óleos encontrados em microalgas promissoras para fins energéticos, na faixa dos 20 a 50% do peso seco, como reportado por CHISTI, 2007.

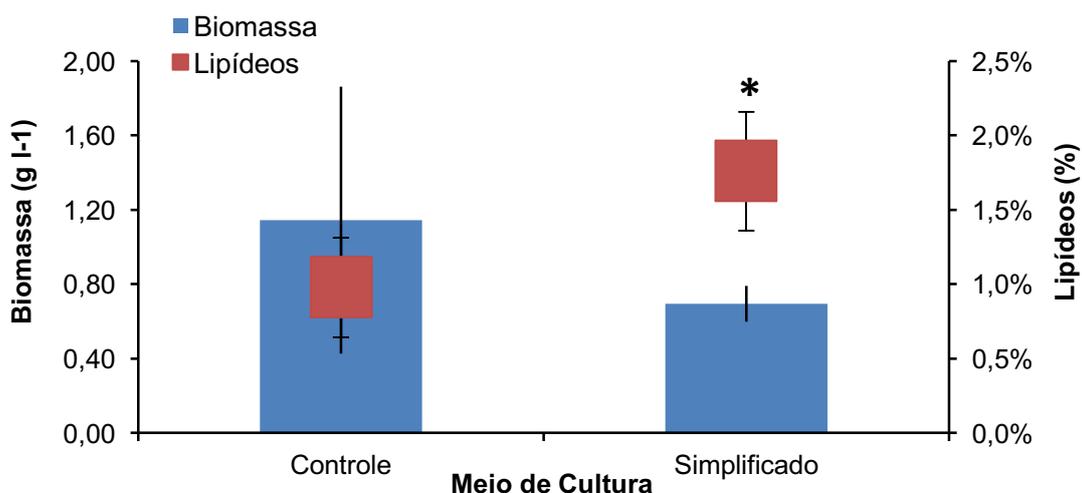


Figura 21: Média dos valores de biomassa e teor lipídico na etapa de validação do meio de cultura controle e simplificado. O asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,10$; ANOVA) entre os valores de lipídeos das biomassas avaliadas para cada um dos meios.

A Figura 22 apresenta a média dos valores de biomassa e de ureia em função dos dias de cultivo na etapa de validação do meio simplificado (MS).

Os resultados da concentração de ureia (mg l^{-1}) nos ensaios da condição do meio simplificado indicam um consumo de ureia de aproximadamente $53,7 \text{ mg l}^{-1}$ e os ensaios da condição do meio controle indicam um consumo total de ureia (Figura 22).

O fato da ureia ter sido consumida de forma integral no meio controle pode ser um indicativo que essa forma de nitrogênio foi utilizada para promover o crescimento celular em um meio de cultura rico em nutrientes. O comportamento diferente observado no meio simplificado pode ser explicado pela hipótese de que em uma condição de estresse, ocasionada pela redução de compostos e concentrações, o nitrogênio pode ser utilizado para o acúmulo lipídico e não para crescimento. Segundo Benemann Jr (2010), as microalgas quando submetidas a condições nutricionais limitantes, podem reduzir os processos fotossintéticos, alterando a dinâmica de formação de moléculas com potencial energético.

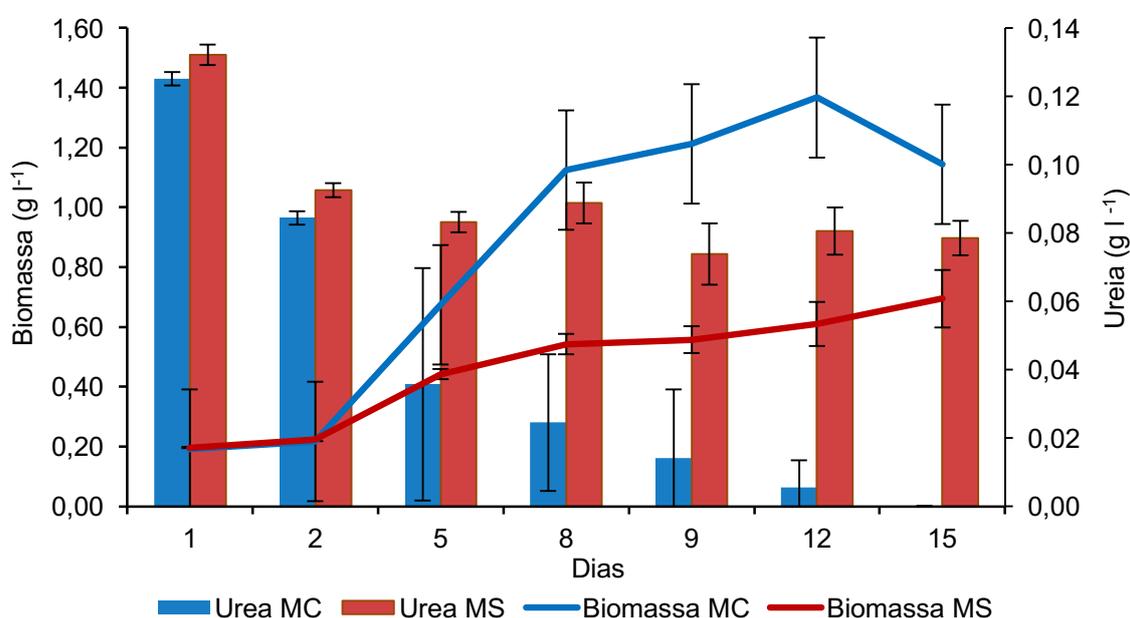


Figura 22: Média dos valores de biomassa e de ureia em função dos dias de cultivo na etapa de validação do meio de cultura simplificado (MS). O meio de cultura controle (MC) foi utilizado nos testes de validação.

A microalga estudada pertencente à classe Trebouxiophyceae não apresenta potencial para a produção de lipídeos, já que, apesar da simplificação do meio de cultura em componentes e concentrações, a concentração lipídica final não é suficiente para fins energéticos. O teor lipídico, com o perfil adequado, ideal para a utilização para fins energéticos deverá ser superior a 25%. No trabalho reportado por PENTEADO (2010) foi observado, de forma análoga ao presente estudo, uma redução no número de ensaios, o aumento do percentual lipídico e concentrações finais lipídicas insuficientes para a utilização desta alga para a produção de biocombustíveis. No trabalho supracitado, o meio de cultivo F/2 Guillard foi otimizado

para o cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* para maximizar a produção de lipídeos.

Caso a ferramenta de planejamento de experimentos não tivesse sido utilizada no processo de otimização de meio de cultura da referida microalga, cerca de 16.384 ensaios teriam de ser realizados por técnicas de tentativa e erro, considerando apenas duas condições (níveis) para cada uma das 14 variáveis estudadas (2^{14} ensaios).

Entretanto, com o uso da ferramenta, foram realizados apenas 61 ensaios, o que se configurou em uma redução de cerca de 38 anos de trabalho e uma economia, apenas em homem-hora (HH) considerando apenas um técnico de nível superior para realizar todos os ensaios, de aproximadamente R\$ 67mil/ano.

6.5 Estimativa de preço do meio simplificado

Foi realizada uma comparação do preço do meio de cultura utilizado na planta piloto, denominado controle com o preço do meio simplificado. As Tabelas 22 e 23, respectivamente, apresentam a composição de cada meio de cultura e os respectivos preços por 1000 litros de meio de cultivo.

A redução dos compostos químicos no meio simplificado apresentou uma redução de custo de 38% em comparação ao meio controle. Esta redução de custo reflete em um ganho econômico significativo, quando se avalia sob a perspectiva de uma escala superior. Entretanto, as formulações de meios de cultura sintéticos por mais simples que sejam, não contribuirão para a economicidade de uma processo de produção de biomassa em uma escala industrial (RAWAT et al., 2013). Em uma escala industrial a utilização de efluentes industriais ricos em nitrogênio e fósforo se caracteriza como uma forma sustentável de se produzir biomassa algácea a um baixo custo. Adicionalmente, como uma forma também de compensação aos impactos ambientais (SORATANA; LANDIS, 2011).

No presente trabalho foram utilizadas fontes alternativas de nitrogênio (ureia) e fósforo (MAP), visando a economicidade no processo de otimização do meio de cultura. O mesmo não foi observado no trabalho reportado por HAKALIN (2014), no qual a fonte de nitrogênio otimizada para a microalga *Scenedesmus* sp. foi o nitrato. Além da utilização de uma fonte mais cara de nitrogênio, a otimização não foi realizada para todos os componentes do meio de cultivo (ASM1). Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) somente para o nitrato, fosfato e vitaminas. Para uma completa otimização do meio de cultura, todos os componentes do meio de cultivo deveriam ter sido avaliados no planejamento experimental, para o cálculo do efeito resultante das interações de todos os componentes. Adicionalmente à substituição da fonte de nitrogênio, o uso de vitaminas, deveria ter sido retirado para a obtenção da sustentabilidade econômica do processo.

O processo de exploração no meio natural dos compostos químicos (N, P, K, Mg, etc.) utilizados como nutrientes nos meios de cultivo de microalgas resulta em impactos ambientais negativos. Esses impactos estão relacionados a uma elevada emissão de gases do efeito estufa e consumo de energia, contribuindo de forma negativa no ciclo de vida dos processos produtivos de microalgas (CLARENS et al.,

2009, 2011). Adicionalmente, o excesso de nutrientes no meio de cultivo pode contribuir para a ocorrência do fenômeno de eutrofização dos corpos hídricos, quando ocorre o descarte de água residual não tratada do cultivo (ABDEL-RAOUF, 2012; PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

Tabela 22: Estimativa de preço do meio de cultura controle.

Componentes	Meio de cultura (R\$ 1000l⁻¹)
EDTA dissódico	0,13
Ácido cítrico	0,15
Cloreto férrico	1,68
Ureia	5,88
Fosfato de monoamônio	0,03
Sulfato de magnésio	3,46
Metais traço	0,27
Custo total	11,6

Tabela 23: Estimativa de preço do meio de cultura simplificado.

Componentes	Meio de cultura (R\$ 1000l⁻¹)
Ureia	6,30000
Fosfato de monoamônio	0,00216
Sulfato de magnésio	0,92200
Custo total	7,20000

7 CONCLUSÃO

A utilização da ferramenta estatística de desenho de experimentos (DOE) permitiu uma redução significativa do número de ensaios, economizando tempo e recursos financeiros para a obtenção de resultados representativos.

A partir dos resultados foi possível reduzir em nove componentes a composição química do meio BG-11 modificado, sendo que deste total, seis correspondem a compostos da solução de metais traço. O meio de cultivo simplificado apresentou concentração lipídica superior ao meio controle e deverá ser utilizado na etapa final dos cultivos destinados à obtenção de biomassa com aumento do conteúdo lipídico para fins energéticos.

Os resultados dessa pesquisa promoveram uma redução de 38% no custo do meio simplificado em comparação ao meio de cultura controle utilizado na planta piloto da PETROBRAS, apresentando um custo final de R\$ 7,2 por 1000 litros de cultivo. Este valor possibilita uma significativa redução no preço da biomassa algácea produzida, gerando impacto positivo na precificação do produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.
- ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 1968.
- ALLEN, M. M.; STANIER, R. Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae. **Journal of general microbiology**, v. 51, n. 2, p. 199–202, 1968.
- ALQUEZAR, R.; GLENDENNING, L.; COSTANZO, S. The use of the brown macroalgae, *Sargassum flavicans*, as a potential bioindicator of industrial nutrient enrichment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, n. 1-2, p. 140–146, 2013.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402–3410, 2011.
- BENEMANN, J. R. Microalgae biomass and biofuels economics. International microalgae and biofuels workshop. Brazilian Network on Green Chemistry,. **Anais**. Fortaleza, Brazil. 2010
- BLANCO, A. C.; NADAOKA, K.; YAMAMOTO, T. Planktonic and benthic microalgal community composition as indicators of terrestrial influence on a fringing reef in Ishigaki Island, Southwest Japan. **Marine Environmental Research**. v. 66, p. 520–535, 2008.
- 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, 2009.
- CAMPAÑA-TORRES, A.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; LÓPEZ-ELÍAS, J. A.; PORCHAS-CORNEJO, M. A. Productive response of *Nannochloropsis oculata*, cultured in different media and their efficiency as food for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Respuesta productiva de *Nannochloropsis oculata*, cultivada en diferentes medios y su eficiencia. **International Journal of Experimental Botany**, v. 81, n. 1, p. 45–50, 2012.
- CAMPBELL, P. K.; BEER, T.; BATTEN, D. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 50–6, jan. 2011.
- CARDOSO A. S.; SILVA FILHO, S. M. P.; ALVES, A. E.; ROCHA, C. M. C; CUNHA, M. C. C. Fitoplâncton como bioindicador de eventos extremos na bacia do rio Una, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**. v. 6. n. 4 p. 697–710, 2013.

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.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource technology**, v. 101, n. 9, p. 3097–3105, 2010.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2007.

CHISTI, Y.; YAN, J. Energy from algae: Current status and future trends. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3277–327, 2011.

CHOW, M. C.; JACKSON, W. R.; CHAFFEE, A. L.; MARSHALL, M. Thermal Treatment of Algae for Production of Biofuel. v. 27, n. 4, p. 1926–1950, 2013.

CHU, F. F.; CHU, P. N.; SHEN, X. F.; LAM, P. K.; ZENG, R. J. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource technology**, v. 152, p. 241–6, 2014.

CLARENS, A. F.; RESURRECCION, E. P.; WHITE, M. A.; COLOSI, L. M. Environmental life cycle comparison of algae t other boenergy feedstocks. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1813–1819, 2009.

CLARENS, A. F.; RESURRECCION, E. P.; WHITE, M. A.; COLOSI, L. M. Environmental Impacts of Algae-Derived Biodiesel and Bioelectricity for Transportation. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 17 p. 7554–7560, 2011.

DAMASO, M. C. T; MACHADO, C. M. M.; RODRIGUES, D. S.; BELEM, S. G; SALUM, T. F. C. Bioprocesses for biofuels: an overview of the Brazilian case. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n.6, p. 1–8, 2014.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algaeWater Research, **Water Research**. v. 32, n. 18, p. 4311–4330. 2003.

DEMAZEL, D. Use of algae as an energy source. **Central Nantes Report**. p. 1-26 2008.

Disponível em:

http://www.folkecenter.net/mediafiles/folkecenter/pdf/Report_algae.pdf

Acesso em: 01/08/2015.

DESROSIERS, C.; LEFLAIVEA, J.; EULINB, A.; TEN-HAGEA, L. Bioindicators in marine waters : Benthic diatoms as a tool to assess water quality from eutrophic to oligotrophic coastal ecosystems. **Ecological Indicators**, v. 32, p. 25–34, 2013.

EL-SHEEKH, M.; ABOMOHRRA, A. E.-F.; HANELT, D. Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 915–22, maio 2013a.

ENRÍQUEZ, M. A. R. S. Economia dos Recursos Naturais. In: MAY, P. H.; LUSTOSA, M. C.; VINHA, V. (Org.). **Economia do Meio Ambiente - Teoria e Prática**. 1a. ed. Editora Campus Elsevier, Rio de Janeiro, p. 33-6, 2003.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. C.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; NETO, J. A. A.; MENEZES, R. S. **BIODIESEL DE MICROALGAS: AVANÇOS E DESAFIOS**. **Quimica Nova**, v. 36 n. 3, 437-448, 2013.

GHATAK, H. R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 8, p. 4042–4052, out. 2011.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Boston, MA: Springer US, 1975.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G. M. AlgaeBase - World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.

Disponível em: <http://www.algaebase.org>

Acesso em 06/08/2015.

HAKALIN, N. L. S. **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, p. 155, 2014.

HODAIFA, G.; SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, M. E.; ÓRPEZ, R. Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium. **Applied Energy**, v. 104, p. 345–352, abr. 2013.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

IYOVO, G. D.; DU, G.; CHEN, J. Sustainable Bioenergy Bioprocessing : Biomethane Production , Digestate as Biofertilizer and as Supplemental Feed in Algae Cultivation to Promote Algae Biofuel Commercialization. **Journal Microbial Biochemistry Technology**, v. 2, n. 4, p. 100–106, 2010.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 10, p. 5179–5183, 15 out. 2009.

JONES, C. S.; MAYFIELD, S. P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 346–351, 2012.

JORQUERA, O.; KIPERSTOK, A.; SALES, E. A.; EMBIRUÇU, M.; GHIRARDI, M. L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource technology**, v. 101, n. 4, p. 1406–13, 2010.

JUSOH, M.; LOH, S. H.; CHUAH, T. S.; AZIZ, A.; CHA, T. S. Elucidating the role of jasmonic acid in oil accumulation, fatty acid composition and gene expression in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) during early stationary growth phase. **Algal Research**, v. 9, p. 14–20, 2015.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas; Princípios e Aplicações**. RIMA, São Carlos, p. 606, 2007

LYKO, H.; DEERBERG, G.; WEIDNER, E. Coupled production in biorefineries-Combined use of biomass as a source of energy, fuels and materials. **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 1, p. 78–86, 1 jun. 2009.

MAZNAH, W.; OMAR, W. Perspectives on the Use of Algae as Biological Indicators for Monitoring and Protecting Aquatic Environments, with Special Reference to Malaysian Freshwater Ecosystems. **Tropical Life Sciences Research** v. 21, n. 2, p. 51–67, 2010.

MENDES, M. C. Q. GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 691–696, 2012.

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

PARK, G. J. **Analytic Methods for Design Practice**. Springer-Verlag, London, p. 627, 2007.

PATHAK, B.; CHAUDHARI, S.; FULEKAR, M. H. Biomass - Resource for sustainable development. **International Journal of Advancements in Research & Technology**, v. 2, n. 6, p. 271–289, 2013.

PENTEADO, D. M. R. **Estudo de otimização de meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para a produção de lipídeos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p. 114, 2010.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 17–25, 2011.

RASHID, N.; REHMANB, M. S. U.; SADIQD, M.; MAHMOODE, T.; HANB, J. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 760–778,. 2014.

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

REIS, C. E. R.; AMARAL, M. S.; LOURES, C. C. A.; RÓS, P. C. M.; HU, B.; IZÁRIO FILHO, H. J.; CASTRO, H. F.; GIANESELLA, S. M. F.; SILVA, M. B. Microalgal Feedstock for Bioenergy: Opportunities and Challenges. In: S. S. DA SILVA AND A. K. CHANDEL (eds.), **Biofuels in Brazil**, Springer International Publishing, Switzerland, p. 367-392. 2014.

RICHMOND, A. (Editor) - **Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phycology**. Wiley-Blackwell, Oxford, 2 ed., 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processo**. 2 ed. Casa do Pão, Campinas, p. 358, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. 1st. ed. CRC Press, Boca Raton, p. 336 2014.

SHELDON, R. A. Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals: Molecules, methods and metrics. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 3–13, jun. 2011.

SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (EDS.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Boston, MA: Springer US, 1975.

SORATANA, K.; LANDIS, A. E. Evaluating industrial symbiosis and algae cultivation from a life cycle perspective. **Bioresource technology**, v. 102, n. 13, p. 6892–6901, 2011.

STIG, W.; NILSSON, R.; RASMUSSEN, Y. **The influence of lipolytic activity on the determination of the fat content in milk and dairy products with the Schmid-Bondzynski-Ratzlaff method**. Alnarp, 1959.

SUNDA, W. G.; PRICE, MOREL, F. M. M. Trace Metal Ion Buffers and Their Use in Culture In. Andersen, R. A. **Algal culturing techniques**. Elsevier Academic Press. Burlington, p. 589. 2005.

TALEBI, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI. M.; HADAVAND MIRZAEI, H.; MIRZAJANZADEH, M.; MALEKZADEH SHAFAROUFI, S.; BAKHTIARI, S.; Fatty acids profiling: A selective

criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TAN, Y.; LIN, J. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 10131–5, nov. 2011.

TERRY, K. L.; RAYMOND, L. P. System design for the autotrophic production of microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 10, p. 474–487, 1985.

TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICOLO, P. Ecotoxicology and Environmental Safety Biochemical biomarkers in algae and marine pollution : A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 71, p. 1–15, 2008.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, 4021–4028, 2008.

WILLIAMS, P. J. L. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 5, p. 554, 2010.

XIA, L.; Ge, H.; Zhou, X.; Zhang, D.; Hu, C. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **Bioresource technology**, v. 144, p. 261–7. 2013.

XIN, L.; Hu, H. Y.; Ke, G.; Sun, Y. X. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 2010.

YEESANG, C.; CHEIRSILP, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3034–40, 2011.