UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO "STRICTO SENSU" EM ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE UM FOTOBIORREATOR DE PLACAS PLANAS PARA CULTIVO DE MICROALGAS COM ALTA DENSIDADE CELULAR

CAMILA LARISSA HINTERHOLZ

TOLEDO – PARANÁ
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO "STRICTO SENSU" EM ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE UM FOTOBIORREATOR DE PLACAS PLANAS PARA CULTIVO DE MICROALGAS COM ALTA DENSIDADE CELULAR

CAMILA LARISSA HINTERHOLZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Profª. Drª. Daniela Estelita Goes Trigueros
Coorientadores: Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes
Prof. Dr. Alexander Dimitrov Kroumov

TOLEDO – PARANÁ
2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Hinterholz, Camila Larissa
Desenvolvimento de um fotobiorreator de placas planas para cultivo de microalgas com alta densidade celular / Camila Larissa Hinterholz; orientador(a), Daniela Estelita Goes Trigueros; coorientador(a), Aparecido Nivaldo Módenes, coorientador(a)II, Alexander Dimitrov Kroumov, 2018.
194 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

1. Microalgas. 2. Fotobiorreator de placas planas. 3. Modelagem matemática. 4. Fluidodinâmica computacional. I. Trigueros, Daniela Estelita Goes. II. Módenes, Aparecido Nivaldo. III. Kroumov, Alexander Dimitrov. IV. Título.

CAMILA LARISSA HINTERHOLZ

Desenvolvimento de um fotobiorreator de placas planas para cultivo de microalgas com alta densidade celular.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração Desenvolvimento de Processos, linha de pesquisa Processos Químicos e Bioquímicos, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Daniela Estelita Goes Trigueros

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)

Carlos Eduardo Borba

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)

Nyamien Yahaut Sebastien

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)

Fabiano Bisinella Scheufele

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ (UTFPR)

Robson Luciano de Almeida

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Toledo (PUC-Toledo)

Toledo, 13 de novembro de 2018

Primeiramente, ao meu amado companheiro Pedro Henrique, meu maior incentivador, amigo e companheiro, por toda a contribuição pessoal e profissional, incansável dedicação, amor, compreensão e paciência, e com quem eu divido essa conquista,

Aos meus pais, Gerson e Mariane, por estarem presentes em todos os momentos importantes de minha existência, pelo apoio e dedicação incondicionais, e por terem me ensinado valores importantes,

À minha irmã Amanda, pela parceria e amor, por alegrar a todos com seu jeito meigo e doce, e pela ajuda na realização dos experimentos,

Aos Professores Drª. Daniela Estelita Goes Trigueros e Dr. Aparecido Nivaldo Módenes, não apenas pela orientação e ensinamentos transmitidos, mas também pela paciência, dedicação e palavras de incentivo, que foram muito importantes para a minha formação,

Ao Prof. Dr. Alexander Dimitrov Kroumov, pela idealização do projeto e pela transmissão de seu extenso conhecimento na área,

Aos Professores Dr. Carlos Eduardo Borba, Dr. Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones e Dr. Fabiano Bisinella Scheufele, pelo apoio e conhecimento dividido durante a execução do projeto, e à Cleusa, Anna Puebla, Ângela e Mariane, pelo apoio e amizade,

Aos parceiros de laboratório Vanessa, Adilson, Murilo e Amanda pelo apoio e auxílio na execução do projeto,

À Ariádine, Caroline, Silvane e Ronas, pela amizade,

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Unioeste,

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro,

Meus Agradecimentos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **10**
LISTA DE TABELAS **13**
NOMENCLATURA **15**
RESUMO **18**
ABSTRACT **20**

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO **22**
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO 23
1.2 OBJETIVOS 24
1.3 JUSTIFICATIVA 25

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **27**
2.1 MICROALGAS: DEFINIÇÃO E FISIOLOGIA 28
2.1.1 FOTOSSÍNTESE OXIGÊNICA 29
2.1.1.1 Estrutura dos cloroplastos 30
2.1.1.2 Reações luminosas 30
2.1.1.3 Reações químicas 32
2.2 CULTIVO DE MICROALGAS 34
2.2.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO 34
2.2.1.1 Iluminação 35
2.2.1.2 Temperatura 36
2.2.1.3 Dissociação de macronutrientes 37
2.2.1.3.1 Equilíbrio gás-líquido 40
2.2.1.5 Concentração de O_2 40
2.2.1.6 Potencial hidrogeniônico – pH 40
2.2.1.7 Agitação 42
2.2.1.8 Composição nutricional do meio de cultivo 42
2.2.2 METABOLISMO CELULAR 43
2.2.3 REGIME DE CULTIVO 43
2.2.4 SISTEMAS DE CULTIVO 44
2.2.4.1 Sistemas abertos 45
2.2.4.2 Sistemas fechados 45
2.3 VARIÁVEIS DE PROJETO DE FOTOBIORREATORES FECHADOS 47

2.3.1 RAZÃO ÁREA/VOLUME 47
2.3.2 AGITAÇÃO 47
2.3.3 TROCA GASOSA 48
2.3.4 CONTROLE DA TEMPERATURA 48
2.3.5 MATERIAL DE CONSTRUÇÃO 49
2.4 TEORIA GERAL DE SISTEMAS (TGS) 49
2.4.1 TGS APLICADA À MODELAGEM DA FIXAÇÃO DO CO_2 POR MICROALGAS 50
2.5 TRANSFERÊNCIA DE MASSA 50
2.5.1 TEORIA DOS DOIS FILMES ESTAGNADOS 51
2.5.2 ESTIMATIVA DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO INDIVIDUAL DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA - κLa 52
2.6 MODELAGEM DA FLUIDODINÂMICA 53
2.6.1 SISTEMAS MONOFÁSICOS 55
2.6.1.2 Modelos de turbulência – sistema monofásico 55
2.6.2 SISTEMAS MULTIFÁSICOS 57
2.6.2.1 Modelos de escoamento 58
2.6.2.2 Modelos de turbulência – sistema multifásico 59
2.7 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR 59
2.7.1 MODELOS FENOMENOLÓGICOS 60
2.7.2 TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO 61
2.8 ALGORITMO GENÉTICO 61
2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 64
2.9.1 ANOVA UNIFATORIAL 65
2.9.2 ANOVA MULTIFATORIAL 67
2.9.3 TESTES DE HOMOGENEIDADE DA VARIÂNCIA 70
2.9.3.1 Estatística χ^2 de Bartlett 70
2.9.3.2 Estatística de Cochran 70
2.9.3.3 Estatística de Hartley 71
2.9.4 TESTES DE NORMALIDADE DAS OBSERVAÇÕES 71
2.9.4.1 Teste de Kolmogorov-Smirnov 71
2.9.4.2 Teste de Lilliefors 72
2.9.4.3 Teste de Shapiro-Wilk 72
2.9.5 COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS EM SEGUIDA À ANOVA 72
2.9.5.1 Teste de Mínima Diferença Significativa de Fisher 73
2.9.5.2 Teste de Diferença Honestamente Significativa de Tukey 73
2.9.5.3 Teste múltiplo de Duncan 74

2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS 74

CAPÍTULO 3 – ESTADO DA ARTE 75

3.1 CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA FECHADO 76

3.2 UTILIZAÇÃO DAS MICROALGAS 77

3.2.1 NUTRIÇÃO HUMANA E ANIMAL 78

3.2.2 PRODUTOS FARMACÊUTICOS, COSMÉTICOS E QUÍMICA FINA 78

3.2.3 BIOCOMBUSTÍVEIS 78

3.2.4 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS E EFLUENTES INDUSTRIAIS 79

3.3 *POTERIOOCHROMONAS MALHAMENSIS* 79

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 80

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS 81

4.1 PROJETO E CONSTRUÇÃO DOS FOTOBIORREATORES 82

4.1.1 SISTEMA DE INJEÇÃO DE GÁS 83

4.1.2 SISTEMA DE ILUMINAÇÃO 83

4.1.3 MÓDULO PARA OTIMIZAÇÃO DOS CICLOS CLARO/ESCURO 85

4.2 PREPARO DE INÓCULO 86

4.2.1 MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS 86

4.2.2 MICROALGA UTILIZADA 86

4.2.2.1 Coleta 86

4.2.2.2 Isolamento 87

4.2.2.3 Identificação molecular 88

4.2.3 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS 88

4.2.4 CULTIVO DE ATIVAÇÃO 88

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS 88

4.3.1 OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR 88

4.3.2 COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA BIOMASSA 89

4.3.3 INTENSIDADE LUMINOSA E CONCENTRAÇÃO DE CO_2 E O_2 89

4.3.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS 90

4.3.5 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS 90

4.3.6 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS 91

4.3.7 DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS 91

4.4 ESTUDO DO PROCESSO DE CULTIVO 92

4.4.1 PRIMEIRO NÍVEL HIERÁRQUICO – ESTUDO DO PBR 93

4.4.1.1 Estudo da transferência de massa 93

4.4.1.1.1 Modelagem matemática da TM 93
4.4.1.1.2 Estudo da TM a partir de planejamento experimental 93
4.4.1.2 Modelagem da hidrodinâmica 95
4.4.1.2.1 Simulações da fluidodinâmica computacional 95
4.4.1.3 Influência do módulo de dispersão de bolhas sobre o crescimento celular 97
4.4.2 SEGUNDO NÍVEL HIERÁRQUICO – ESTUDO DA MICROALGA 98
4.4.2.1 Avaliação da tolerância da cepa frente às diferentes condições do sistema 98
4.4.2.2 Otimização do meio de cultivo 99
4.4.2.3 Influência da composição do meio de cultivo sobre o crescimento e a composição centesimal das células 100
4.4.2.4 Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento e a composição centesimal das células 101
4.4.3 TERCEIRO NÍVEL HIERÁRQUICO – MODELAGEM DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS EM PBR .. 101
4.4.3.1 Escolha dos modelos cinéticos de crescimento algal 103
4.4.3.2 Balanços de massa em sistema descontínuo 103
4.4.4 QUARTO NÍVEL HIERÁRQUICO – MODELO SIMPLIFICADO 104
4.4.4.1 Modelo simplificado do sistema 104
4.4.4.2 Dados experimentais para o procedimento de estimação dos parâmetros 104
4.4.4.3 Estimação de parâmetros 105
4.4.4.4 Algoritmo genético 106

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 108

5.1 COLETA E ISOLAMENTO DA CEPA DE MICROALGA 109
5.2 ESTUDO DO PROCESSO DE CULTIVO 110
5.2.1 PRIMEIRO NÍVEL HIERÁRQUICO – ESTUDO DO PBR 110
5.2.1.1 Modelos teóricos da cinética de transferência de massa 110
5.2.1.2 Estudo da transferência de massa – planejamento experimental 111
5.2.1.3 Estudo da hidrodinâmica – Computacional 129
5.2.1.4 Influência do módulo de dispersão de bolhas sobre o crescimento celular 133
5.2.1.5 Considerações finais – Nível I 135
5.2.2 SEGUNDO NÍVEL HIERÁRQUICO – ESTUDO DA MICROALGA 136
5.2.2.1 Avaliação da tolerância da cepa frente às diferentes condições do sistema 136
5.2.2.2 Otimização do meio de cultivo 140
5.2.2.3 Influência da composição do meio de cultivo sobre o crescimento e a composição centesimal das células 143

5.2.2.4 Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento e a composição centesimal das células 151
5.2.2.5 Considerações finais – Nível II 158
5.2.3 TERCEIRO NÍVEL HIERÁRQUICO – MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO 158
5.2.3.1 Cinética de crescimento de *P. malhamensis* em cultivo descontínuo 158
5.2.4 QUARTO NÍVEL HIERÁRQUICO – MODELO SIMPLIFICADO 160
5.2.4.1 Formulação do modelo simplificado 160
5.2.4.2 Estimação de parâmetros 161
5.2.4.3 Considerações finais – Nível IV 166

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES 167

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 170
APÊNDICE A – CURVA DE CORRELAÇÃO DA ABSORBÂNCIA 192
ANEXO A – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA MICROALGA 193
A.1 METODOLOGIA 193
A.2 REFERÊNCIAS 194

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – ESQUEMA GERAL DA FOTOSSÍNTESE OXIGÊNICA 30
FIGURA 2.2 – ARRANJO VETORIAL DA FOTOSSÍNTESE NA MEMBRANA DO TILACÓIDE 31
FIGURA 2.3 – ESQUEMA-Z DO TRANSPORTE DE ENERGIA (EM) DESDE ELÉTRONS DA ÁGUA AO $NADPH_2$. 32
FIGURA 2.4 – REAÇÕES DO CICLO DE CALVIN-BENSON 33
FIGURA 2.5 – ESPÉCIES DE CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO EM ÁGUA EM FUNÇÃO DO PH 41
FIGURA 2.6 – CURVAS DE CRESCIMENTO CELULAR (—) E DE CONSUMO DE NUTRIENTES (---) EM CULTIVO BATELADA 44
FIGURA 2.7 – ESQUEMA TÍPICO DE UM REATOR DO TIPO *RACEWAY* 45
FIGURA 2.8 – ESQUEMA DE UM PBR TUBULAR 46
FIGURA 2.9 – ESQUEMA DE UM PBR DO TIPO *FLAT PLATE* 46
FIGURA 2.10 – RESISTÊNCIAS ASSOCIADAS À DISSOLUÇÃO E CONSUMO DE CO_2 51
FIGURA 2.11 – INTERFACE GÁS-LÍQUIDO COM AS PELÍCULAS ESTAGNADAS 52
FIGURA 2.12 – ELEMENTO DE VOLUME DA EQUAÇÃO DA CONTINUIDADE 53
FIGURA 2.13 – MÉTODOS DE SELEÇÃO, CRUZAMENTO E MUTAÇÃO DOS ALGORITMOS GENÉTICOS, SENDO: (A) SELEÇÃO POR ROLETA; (B) SELEÇÃO POR TORNEIO; (C) SELEÇÃO POR DIZIMAÇÃO; (D) CRUZAMENTO POR PONTO ÚNICO; (E) CRUZAMENTO POR PONTO DUPLO; (F) CRUZAMENTO POR PONTOS ALEATÓRIOS; (G) MUTAÇÃO ALEATÓRIA; E (H) MUTAÇÃO POR TROCA 63
FIGURA 4.1 – PROJETO DO PBR1 E PBR2: (A) ENTRADA DE GÁS; (B) RETIRADA DE AMOSTRA E (C) SAÍDA DE GÁS. 82
FIGURA 4.2 – SISTEMA DE GÁS: (A) CILINDRO DE CO_2 COMPRIMIDO; (B) COMPRESSOR DE AR ODONTOLÓGICO; (C) FILTRO DE AR ODONTOLÓGICO; (D) FLUXÔMETRO E (E) ENTRADA PARA O PBR 83
FIGURA 4.3 – ESQUEMA DOS MÓDULOS EXPERIMENTAIS CONSTRUÍDOS PARA A ILUMINAÇÃO DOS PBRS 84
FIGURA 4.4 – ESQUEMAS DAS CONFIGURAÇÕES DE DISPERSÃO DE BOLHAS PROPOSTAS PARA O ESTUDO DA HIDRODINÂMICA: (A) PBR_A; (B) E (C) MÓDULOS DE DISPERSÃO DE BOLHAS DOS PBR_B (D) E PBR_C (E), RESPECTIVAMENTE. 85
FIGURA 4.5 – REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE INOCULAÇÃO POR ESTRIAMENTO 87
FIGURA 4.6 – DIVISÃO DAS ETAPAS DO ESTUDO DO PROCESSO DE CULTIVO DE MICROALGAS EM PBRS DE PLACAS PLANAS 92
FIGURA 4.7 – CORTES LATERAIS DOS PBRS NO ESTUDO DA HIDRODINÂMICA: (A) FRONTEIRAS DE SAÍDA E (B) DE ENTRADA 96
FIGURA 4.8 – FLUXOGRAMA DO SISTEMA DE EQUAÇÕES DO MODELO PROPOSTO PARA DESCREVER OS DADOS EXPERIMENTAIS DO CULTIVO DE MICROALGAS 102
FIGURA 4.9 – ESQUEMA DO CULTIVO FECHADO DE MICROALGAS: (A.1) CORRENTE DE ENTRADA DE AR; (A.2) CORRENTE DE ENTRADA DE CO_2, (B) CORRENTE DE SAÍDA DO GÁS, (C) E (D) LINHAS DE GÁS; (E) RESERVATÓRIO DO GÁS; (F) PBR_2 E (G) BOMBA DE CIRCULAÇÃO DO GÁS. AS SETAS INDICAM O SENTIDO DO FLUXO DE GÁS. 105
FIGURA 4.10 – ESQUEMA DO ALGORITMO IMPLEMENTADO PARA A BUSCA DE PARÂMETROS DOS MODELOS 107
FIGURA 5.1 – CÉLULAS PRESENTES NA AMOSTRA APÓS O PROCEDIMENTO DE ISOLAMENTO 109
FIGURA 5.2 – DISPERSÃO DOS RESÍDUOS EM FUNÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS ENSAIOS PARA AS VARIÁVEIS: (A) $KLaO2$; (B) $KLaCO2$; (C) $O2eq$ E (D) $CO2eq$ 113
FIGURA 5.3 – GRÁFICOS DAS MÉDIAS MARGINAIS PARA O $KLaO2$ 115

FIGURA 5.4 – GRÁFICOS DAS MÉDIAS MARGINAIS PARA O $KLaCO2$ 115
FIGURA 5.5 – GRÁFICOS DAS MÉDIAS MARGINAIS PARA O $O2eq$ 116
FIGURA 5.6 – GRÁFICO DAS MÉDIAS MARGINAIS PARA O $CO2eq$ 116
FIGURA 5.7 – GRÁFICO DE PARETO REPRESENTANDO OS EFEITOS PARA O $KLaO2$ 118
FIGURA 5.8 – GRÁFICO DE PARETO REPRESENTANDO OS EFEITOS PARA O $KLaCO2$ 118
FIGURA 5.9 – GRÁFICO DE PARETO REPRESENTANDO OS EFEITOS PARA O $O2eq$ 119
FIGURA 5.10 – GRÁFICO DE PARETO REPRESENTANDO OS EFEITOS PARA O $CO2eq$ 119
FIGURA 5.11 – VALORES OBSERVADOS VERSUS PREDITOS: (A) $KLaO2$; (B) $KLaCO2$; (C) $O2eq$ E (D) $CO2eq$ 123
FIGURA 5.12 – VALOR NORMAL ESPERADO VERSUS RESÍDUOS PARA AS VARIÁVEIS: (A) $KLaO2$; (B) $KLaCO2$; (C) $O2eq$ E (D) $CO2eq$ 123
FIGURA 5.13 – RESÍDUOS VERSUS VALORES PREDITOS PARA AS VARIÁVEIS: (A) $KLaO2$; (B) $KLaCO2$; (C) $O2eq$ E (D) $CO2eq$ 124
FIGURA 5.14 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA A VARIÁVEL $KLaO2$ 125
FIGURA 5.15 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE $KLaCO2$ 126
FIGURA 5.16 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE $O2eq$ 127
FIGURA 5.17 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DE $CO2eq$ 128
FIGURA 5.18 – SIMULAÇÃO DO FLUXO MONOFÁSICO NO INTERIOR DO PBR_2, ONDE A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA REPRESENTA A MAGNITUDE DA VELOCIDADE (M S^{-1}) E AS LINHAS DENOTAM O CAMPO DE VELOCIDADE 130
FIGURA 5.19 – SIMULAÇÃO DO FLUXO MULTIFÁSICO NO INTERIOR DO PBR_2 ONDE A SUPERFÍCIE REPRESENTA A MAGNITUDE DA VELOCIDADE (M S^{-1}) E AS LINHAS DENOTAM O CAMPO DE VELOCIDADE 131
FIGURA 5.20 – PERFIL DE VELOCIDADE EM FUNÇÃO DA ALTURA DO PBR PARA: (A) E (B) PBR_A; (C) E (D) PBR_B; (E) E (F) PBR_C E (G) COEFICIENTE DE DISPERSÃO DA FASE GASOSA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO LATERAL DO PBR. AS LINHAS DE CORTE APRESENTAM-SE AO LADO DOS GRÁFICOS. 132
FIGURA 5.21 – PERFIL DE CRESCIMENTO DE *P. MALHAMENSIS* EM PBR COM E SEM O MÓDULO INTERNO DE DISPERSÃO DE BOLHAS 134
FIGURA 5.22 – PERFIL DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *P. MALHAMENSIS* SEM LIMITAÇÕES 137
FIGURA 5.23 – TAXA DE CRESCIMENTO PARA DIVERSOS INTERVALOS DO CULTIVO DE *P.MALHAMENSIS* 139
FIGURA 5.24 – PERFIL DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *P. MALHAMENSIS* UTILIZANDO-SE AS CONDIÇÕES FAVORÁVEIS AO CRESCIMENTO 140
FIGURA 5.25 – PERFIL DE CRESCIMENTO DA MICROALGA UTILIZANDO-SE OS MEIOS M-8 E BG-11 ORIGINAIS E OTIMIZADOS .. 143
FIGURA 5.26 – VALORES MÉDIOS COM ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E DO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS CLOROFILA-A, CLOROFILA- E CAROTENOIDES EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA UTILIZADO 147
FIGURA 5.27 – PERFIL DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *P. MALHAMENSIS* UTILIZANDO-SE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO 151
FIGURA 5.28 – VALORES MÉDIOS COM ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E DO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS CLOROFILA-A, CLOROFILA- E CAROTENOIDES EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA UTILIZADO 153

FIGURA 5.29 – PERFIS DO CULTIVO DE *POTERIOOCHROMONAS MALHAMENSIS* EM SISTEMA FECHADO 162

FIGURA 5.30 – SIMULAÇÕES DO MODELO PROPOSTO APLICADO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE CRESCIMENTO DE *POTERIOOCHROMONAS MALHAMENSIS* EM CULTIVO FECHADO 164

FIGURA 5.31 – ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS PARÂMETROS DO MODELO PROPOSTO 166

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM PESO SECO TOTAL (%) DE ALGUMAS MICROALGAS 29
TABELA 2.2 – EQUAÇÕES DE DISSOCIAÇÃO E EQUILÍBRIO DAS ESPÉCIES DISSOLVIDAS 39
TABELA 4.1 – PARÂMETROS DE CONSTRUÇÃO DOS PBRS 82
TABELA 4.2 – CONFIGURAÇÃO DOS MÓDULOS EXPERIMENTAIS 84
TABELA 4.3 – VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO PFF PARA ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA 94
TABELA 4.4 – MATRIZ DE ENSAIOS DO PLANEJAMENTO PFF 94
TABELA 4.5 – NÚMERO DE PONTOS DE CÁLCULO GERADO PARA CADA CASO ESTUDADO 97
TABELA 4.6 – FONTES DE NUTRIENTES DOS MEIOS M-8 E BG-11 99
TABELA 4.7 – MODELOS CINÉTICOS QUE REPRESENTAM OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS CONTROLÁVEIS DO SISTEMA 103
TABELA 5.1 – CONDIÇÕES E RESPOSTAS EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO PFF 112
TABELA 5.2 – INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA AS VARIÁVEIS $KLaO2$ E $CO2eq$ 113
TABELA 5.3 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E FALTA DE AJUSTE DOS MODELOS AJUSTADOS 114
TABELA 5.4 – ANOVA DOS DADOS DE $KLaO2$ 121
TABELA 5.5 –ANOVA DOS DADOS DE $KLaCO2$ 121
TABELA 5.6 –ANOVA DOS DADOS DE $O2eq$ 122
TABELA 5.7 –ANOVA DOS DADOS DE $CO2eq$ 122
TABELA 5.8 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS MÉDIAS DOS INTERVALOS DE CRESCIMENTO AVALIADOS 138
TABELA 5.9 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA BIOMASSA DE *P. MALHAMENSIS* 141
TABELA 5.10 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS M-8 E BG-11 ORIGINAIS E OTIMIZADOS 142
TABELA 5.11 – CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DA MICROALGA *P. MALHAMENSIS* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO 144
TABELA 5.12 – ANOVA APLICADA À CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E AO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS 147
TABELA 5.13 – TESTES DE HOMOGENEIDADE DA VARIÂNCIA APLICADA AOS DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E COMPONENTES CELULARES 148
TABELA 5.14 – TESTES DE HOMOGENEIDADE AOS DADOS CORRIGIDOS DE TEOR DE CLOROFILA-A E CLOROFILA-B 148
TABELA 5.15 –ANOVA AOS DADOS CORRIGIDOS DE TEOR DE CLOROFILA-A E CLOROFILA-B 148
TABELA 5.16 – TESTES DE NORMALIDADE DAS OBSERVAÇÕES PARA A CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E O TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS 149
TABELA 5.17 – TESTES DE MDS DE FISHER, DUNCAN E DHS DE TUKEY PARA A CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E AO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA 150
TABELA 5.18 – CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DA MICROALGA *P. MALHAMENSIS* EM FUNÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO 152
TABELA 5.19 – ANOVA APLICADA À CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E AO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS 153

TABELA 5.20 – TESTES DE HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS APLICADA À CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E AO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS 154
TABELA 5.21 – TESTES DE NORMALIDADE DAS OBSERVAÇÕES PARA A CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E O TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS 154
TABELA 5.22 – TESTES DE MDS DE FISHER, DUNCAN E DHS DE TUKEY PARA A CONCENTRAÇÃO DE *P.MALHAMENSIS* E AO TEOR DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PIGMENTOS DAS CÉLULAS EM FUNÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO..... 157
TABELA 5.23 – DADOS DE ENTRADA DO PROCEDIMENTO DE ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS 162
TABELA 5.24 – PARÂMETROS CINÉTICOS E ESTEQUIOMÉTRICOS ESTIMADOS E CALCULADOS 163

NOMENCLATURA

Equilíbrio e transferência de massa gás-líquido

C^*	concentração de gás na saturação	$M\ L^{-3}$
C	concentração de gás no meio líquido	$M\ L^{-3}$
C^{eq}	Concentração de gás dissolvido no equilíbrio	$M\ L^{-3}$
H	constante de Henry	$T^2\ L^{-2}$
p^g	pressão parcial de gás na fase gasosa	$M\ L^{-1}\ T^{-2}$
x_g	fração volumétrica da espécie desejada no gás	---
P	pressão total do gás	$M\ L^{-1}\ T^{-2}$
k_g	coeficiente de transferência da película gasosa	$T^{-1}\ L^{-2}$
p^*	pressão parcial na interface	$M\ L^{-1}\ T^{-2}$
n_g	fluxo por unidade de área interfacial	
k_L	coeficiente de transferência da película líquida	$T^{-1}\ L^{-2}$
k_La	coeficiente volumétrico de transferência de gás	T^{-1}
n_ga	velocidade de transferência de gás	

Especiação do CO_2 em água

k_{f1}	taxa da reação direta de dissociação do CO_2 em água	T^{-1}
k_{f2}	taxa da reação direta de dissociação do HCO_3^- em água	$L^3\ N^{-1}\ T^{-1}$
k_{f3}	taxa da reação direta de reação entre o CO_2 e OH^-	$L^3\ N^{-1}\ T^{-1}$
k_{b1}	taxa da reação direta de dissociação do CO_2 em água	$L^3\ N^{-1}\ T^{-1}$
k_{b2}	taxa da reação direta de dissociação do HCO_3^- em água	T^{-1}
k_{b3}	taxa da reação direta de reação entre o CO_2 e OH^-	T^{-1}

Constantes de equilíbrio iônico

K_w	constante de equilíbrio da água	---
K_1	constante de equilíbrio do CO_2	$N\ L^{-3}$
K_2	constante de equilíbrio do HCO_3^-	$N\ L^{-3}$

Hidrodinâmica

ρ	densidade	$M\ L^{-3}$
u	campo de velocidade	$M\ T^{-1}$
ϕ	tensor fluxo de momento combinado	$M\ L^{-1}\ T^{-2}$
g	aceleração da gravidade	$L\ T^{-2}$

π	tensor fluxo de momento molecular	$M\ L^{-1}\ T^{-2}$
τ	tensor fluxo de momento	$M\ L^{-1}\ T^{-2}$
γ	fração volumétrica de cada fase	$L^3\ L^{-3}$
C_d	coeficiente de arraste viscoso	---
Eö	número de Eötvös	---
Re	número de Reynolds	---
d_b	diâmetro da bolha	L
μ	viscosidade dinâmica	$M\ L\ T^{-1}$
μ_{Turb}	viscosidade turbulenta	$M\ L\ T^{-1}$
P_k	termo de produção de energia cinética	$M\ L^{-1}\ T^{-3}$
k	energia cinética turbulenta	$L^2\ T^{-2}$
F	força de volume adicional	$M\ L^{-2}\ T^{-2}$
ε	termo de dissipação de energia cinética	$L^2\ T^{-3}$
C_μ, $C_{\varepsilon 1}$		
$C_{\varepsilon 2}$, σ_k	constantes do modelo de turbulência	---
σ_ε		

<u>Modelagem matemática</u>

gl	graus de liberdade	---
μ	taxa de crescimento específico	T^{-1}
μ_{max}	taxa máxima de crescimento específico	T^{-1}
k_d	taxa de morte celular	T^{-1}
CO_2	concentração de CO_2 dissolvido	$N\ L^{-3}$
$[HCO_3^-]$	concentração de HCO_3^- dissolvido	$N\ L^{-3}$
$[CO_3^{2-}]$	concentração de CO_3^{2-} dissolvido	$N\ L^{-3}$
[CIT]	concentração total de carbono inorgânico dissolvido	$N\ L^{-3}$
$[H^+]$	concentração de íons H^+	$N\ L^{-3}$
OD	concentração de oxigênio dissolvido	$N\ L^{-3}$
X	concentração de biomassa	$M\ L^{-3}$
I_{av}	intensidade luminosa média	$N\ L^{-2}\ T^{-1}$
yCO_2	concentração de CO_2 na fase gasosa	$N\ N^{-1}$
yO_2	concentração de O_2 na fase gasosa	$N\ N^{-1}$
T	temperatura de operação	θ
T_{min}	temperatura mínima	θ

T_{max}	temperatura máxima	θ
T_{opt}	temperatura ótima	θ
pH	pH de operação	---
pH_{min}	pH mínimo	---
pH_{max}	pH máximo	---
pH_{opt}	pH ótimo	---
K_{sCO2}	constante de saturação do CO_2	$N\ L^{-3}$
K_{sIav}	constante de saturação da irradiância média da luz	$N\ L^{-2}\ T^{-1}$
K_{iIav}	constante de inibição pela irradiância média da luz	$N\ L^{-2}\ T^{-1}$
K_{iOD}	constante de inibição pelo OD	$N\ L^{-3}$
I_{av}	intensidade luminosa dentro do PBR	$N\ L^{-2}\ T^{-1}$
I_0	intensidade da luz incidente	$N\ L^{-2}\ T^{-1}$
E_0		$N^n\ L^{-3n}$
E_1	parâmetros do modelo de luminosidade média	$L^{3n}\ N^{-n}$
n		---

HINTERHOLZ, Camila Larissa. **Desenvolvimento de um fotobiorreator de placas planas para cultivo de microalgas com alta densidade celular.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2018. Tese de doutorado.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo o desenvolvimento de um fotobiorreator (PBR) em escala laboratorial capaz de obter culturas de microalgas com alta densidade celular. Para isto, avaliou-se o cultivo de *Poterioochromonas malhamensis* em um PBR de placas planas, construído com volume útil de 10 L. A cepa desta microalga foi isolada de um lago artificial de Toledo – PR. Todo o estudo foi baseado na Teoria Geral de Sistemas em que se dividiu a pesquisa em quatro níveis hierárquicos. No primeiro nível avaliaram-se os parâmetros da transferência de massa, por meio de um planejamento fatorial fracionado (PFF) considerando-se quatro fatores: vazão de entrada de gás ($Q_{gás}$), CO_2 no gás de entrada (ϕ_{CO2}), concentração de antiespuma (C_{AE}) e salinidade do meio (ϕ_{sal}), cujos valores ajustáveis podem representar a TM para as respostas $K_La_{O_2}$, $K_La_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq}. Com isso, foram verificados experimentalmente os parâmetros: $K_La_{O_2}$ (14,88 a 79,32 h^{-1}) e $K_La_{CO_2}$ (0 a 125,40 h^{-1}), bem como as variações de concentração das espécies dissolvidas no equilíbrio: O_2^{eq} (37,33 a 99,66%) e CO_2^{eq} (0 a 98,33%), respectivamente relativo aos valores de equilíbrio das espécies dissolvidas em água pura. Ainda no primeiro nível, o modelo de Euler-Euler foi utilizado para o estudo da fluidodinâmica dentro do PBR, por meio do *software* Comsol®, sendo avaliadas três configurações: PBR_A – sem dispersor; PBR_B – com dispersor de bolhas simples; e PBR_C – com dispersor perfurado, cuja proposta de dispersão de bolhas garantiu maior frequência dos ciclos claro-escuro, de acordo com as simulações de fluxos de água e de bolhas realizadas em sistema mono e multifásico, respectivamente. A influência do módulo dispersor de bolhas sobre o crescimento celular foi verificada experimentalmente por ensaios feitos com o PBR_A e o PBR_C, a partir dos quais se verificou o aumento de 175% na produção de biomassa (15,7 g L^{-1}) com a utilização do PBR_C. No segundo nível hierárquico, foi estudada a tolerância da cepa frente às condições ajustáveis do sistema: $Q_{gás}$, ϕ_{CO2}, C_{AE}, além de temperatura, condições de iluminação, e concentrações de nutrientes e carbono orgânico, utilizando-se a técnica de pulsos. Dentro das faixas avaliadas, os resultados não mostraram inibição do crescimento, porém este foi acentuado em valores acima de 30°C. Também, neste nível, admitindo-se a produção de 1 g L^{-1} de biomassa, os meios M-8 e BG-11 foram otimizados por programação matemática linear cuja função objetivo sujeita a restrições baseadas na composição elementar da biomassa. Com isso, os

meios originais e otimizados foram avaliados quanto à produção de biomassa, e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-**a**, clorofila-**b** e carotenoides. A ANOVA indicou o melhor meio para a produção de biomassa (M-8), cujos valores otimizados foram preparados nos cultivos de avaliação da fonte de nitrogênio. Nestes, três fontes inorgânicas – NH_4NO_3, $NaNO_3$ e KNO_3; e uma orgânica – ureia foram comparadas, verificando-se pela ANOVA que a fonte mais indicada para a produção de biomassa foi a ureia. No terceiro nível hierárquico, foi proposto um modelo de crescimento com base em balanços de massa e nas definições de velocidade específica de transformação, definição de conversão, reações de dissociação do CO_2 e O_2 em água e a Lei de Henry. Após a aplicação da modelagem fenomenológica de modelos não estruturados e não segregados, obteve-se um conjunto de equações estequiométricas, que foram utilizadas para avaliar modelos cinéticos obtidos da literatura, pelos quais se avaliaram a influência da luz, CO_2 e O_2 dissolvidos, pH e temperatura sobre o crescimento celular. Utilizando-se os resultados alcançados nos níveis anteriores, o estudo do quarto nível indicou que o modelo simplificado proposto para descrever os dados experimentais de cultivo de *Poterioochromonas malhamensis* em PBR fechado (crescimento celular, consumo de CO_2 na fase gasosa, e variação no pH do meio) foi adequado, cujas simulações mostraram-se satisfatórias também para o consumo das espécies de carbono inorgânico dissolvido, bem como para a transferência de massa entre as fases. Nesta etapa, 32 parâmetros cinéticos e estequiométricos foram estimados no ajuste do modelo proposto aos dados experimentais, por meio de um algoritmo baseado nos Algoritmos Genéticos implementado no *software* Maple®. Portanto, o presente estudo apresentou a utilização do módulo dissipador de bolhas perfurado acoplado ao PBR proposto, o que permitiu a obtenção do que se caracteriza por cultura de densidade ultra alta, uma vez que ≈15 g L^{-1} de biomassa foram fornecidos pelo cultivo de *P. malhamensis*. Destacou-se, também, a possibilidade da otimização de condições importantes para o cultivo de biomassa, bem como para o projeto de PBRs, por meio do levantamento de dados experimentais, associado às adequadas metodologias estatísticas de avaliação e à modelagem cinética e fluidodinâmica, conforme se verificou pela Teoria Geral de Sistemas aplicada.

Palavras-chave: microalgas; placas planas*;* fotobiorreator; fluidodinâmica computacional; transferência de massa; modelagem matemática.

HINTERHOLZ, Camila Larissa. **Development of a flat-plate photobioreactor for microalgae cultivation in high-density cultures**. West Paraná State University. 2018. Doctoral thesis.

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a laboratory-scale photobioreactor (PBR) capable of obtaining microalgae cultures with high cell density. For this, the cultivation of *Poterioochromonas malhamensis* was evaluated in a flat-plate PBR, built with a useful volume of 10 L. The microalga strain was isolated from an artificial lake from Toledo – PR. The whole study was based on the System Analysis Theory, in which the research was divided into four hierarchical levels. In the first level, the mass transfer (MT) parameters were evaluated by means of a fractionated factorial design (FFD) considering four factors: gas inlet flow (Q_{gas}), CO_2 in the inlet gas (φ_{CO2}), antifoam concentration (C_{AE}) and salinity of the medium (φ_{sal}), whose adjustable values may represent the MT for the responses $K_La_{O_2}$, $K_La_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq}. Thus, the parameters $K_La_{O_2}$ (14.88 to 79.32 h^{-1}) and $K_La_{CO_2}$ (0 to 125.40 h^{-1}) were verified experimentally, as well as the equilibrium concentration variations: O_2^{eq} (37.33 to 99.66%) and CO_2^{eq} (0 to 98.33%) respectively, relative to the equilibrium values of the species dissolved in pure water. Still in the first level, the Euler-Euler model was used for the study of the fluid dynamics inside the PBR, with the software Comsol®, being evaluated three configurations: PBR_A – without disperser; PBR_B – with simple bubble disperser; and PBR_C – with perforated disperser, whose bubble dispersion proposal ensured a higher frequency of the light-dark cycles, according to the simulations of water and bubbles flows performed in mono and multiphase systems, respectively. The influence of the bubble dispersion module on cell growth was verified experimentally with PBR_A and PBR_C runs, which showed a 175% increase in biomass production (15.7 g L^{-1}) with use of PBR_C. In the second hierarchical level, the tolerance of the strain to the adjustable conditions of the system was studied: Q_{gas}, φ_{CO2}, in addition to temperature, lighting conditions, nutrient concentrations and organic carbon, using the pulse technique. Within the evaluated ranges, the results did not show inhibition of growth, but was accentuated in values above 30 °C. Also, at this level, assuming the production of 1 g L^{-1} biomass, M-8 and BG-11 media were optimized by linear mathematical programming, whose objective function subjected to constraints based elemental composition of the biomass. Therefore, the original and optimized media were evaluated regarding biomass production, as well as

protein, carbohydrate, lipid and pigment chlorophyll-a, chlorophyll-b and carotenoids content of cells. ANOVA indicated the best medium for the production of biomass (M-8), whose optimized values were prepared in the nitrogen source evaluation cultures. In these, three inorganic sources – NH_4NO_3, $NaNO_3$ and KNO_3; and an organic – urea were compared, and it was verified by ANOVA that the most appropriate source for the production of biomass was urea. In the third hierarchical level, a growth model was proposed based on mass balances and the definitions of specific transformation velocity, conversion definition, CO_2 and O_2 dissociation reactions in water and Henry's Law. After applying the phenomenological modeling of unstructured and non-segregated models, a set of stoichiometric equations was built, which were used to evaluate kinetic models obtained from the literature, by which the influence of light, dissolved CO_2 and O_2, pH and temperature on cell growth. Using the results obtained at previous levels, the fourth-level study indicated that the simplified model proposed to describe the experimental data of *Poterioochromonas malhamensis* culture in closed PBR (cell growth, CO_2 consumption in the gas phase, and variation in the pH of the medium) was adequate, whose simulations were also satisfactory for the consumption of the inorganic dissolved carbon species, as well as for the mass transfer between the phases. In this step, 32 kinetic and stoichiometric parameters were estimated in the fit of the proposed model to the experimental data, through an algorithm based on the Genetic Algorithms implemented in the software Maple®. Therefore, this study presented the use of the perforated bubble disperser module coupled to the proposed PBR, which allowed the achievement of what is characterized by ultra-high density culture, since ≈ 15 g L^{-1} of biomass were produced by the culture of *P. malhamensis*. It was also highlighted the possibility of optimizing important conditions for biomass cultivation, as well as for the design of PBRs, through the collection of experimental data, associated to appropriate statistical methodologies of evaluation and to kinetic and fluid dynamics modeling, according to the General Theory of Systems applied.

Keywords: microalgae; flat-plate; photobioreactor; computational fluid dynamics; mass transfer; mathematical modeling

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A importância do desenvolvimento de sistemas viáveis para o cultivo de microalgas está associada à problemas de demanda global de energia provocada pela intensificação do transporte e da industrialização, vinculadas a forte dependência de combustíveis fósseis. O aquecimento global, gerado pela emissão de crescentes concentrações dos gases do efeito estufa, tais como o dióxido de carbono (CO_2), impulsionam a busca por fontes de energia verde – energia limpa e renovável. Neste contexto, as microalgas são alternativas promissoras devido, principalmente, ao fato de utilizarem o CO_2 presente na atmosfera como fonte de carbono do metabolismo celular – fotossíntese – liberando O_2, ao mesmo tempo em que produzem metabólitos de interesse comercial, inclusive ácidos graxos potenciais para a produção de biocombustíveis. Assim, as microalgas são capazes de reduzir o efeito do aquecimento global, pelo consumo do CO_2, bem como pela produção de combustíveis limpos, à medida que reduzem a dependência econômica do petróleo.

Atualmente, o potencial de cultivo de microalgas é bastante claro, porém alguns obstáculos devem ser superados para tornar o processo de cultivo rentável o suficiente para que sua produção seja competitiva no mercado. Para tanto, é de extrema importância que sejam desenvolvidos bioreatores de baixo custo e de fácil operação, capazes de fornecer alto rendimento em biomassa, bem como no produto de interesse. Por isso, os fotobiorreatores (do inglês: *photobioreactors* – PBRs) de placas planas são muito utilizados, pois além de resultarem em alta produtividade em biomassa, boa penetração da luz e ampla área de iluminação, são de fácil esterilização e podem ser instalados em ambientes externos, eliminando custos com a iluminação.

Todo o sistema necessário ao cultivo de microalgas em PBRs é sofisticado e envolve muitas condições e parâmetros inter-relacionados, os quais tornam difíceis a otimização do processo e a obtenção das melhores condições operacionais do cultivo. Uma das questões que impactam a viabilidade da implementação de unidades de produção de microalgas é o baixo rendimento encontrado em PBRs com grandes volumes, tornando necessário o desenvolvimento de sistemas que forneçam culturas de densidade ultra alta. O procedimento de tentativa e erro é um desperdício de tempo, dinheiro e esforços científicos, e, portanto

metodologias avançadas devem ser adotadas, como a teoria geral de sistemas (TGS). Aliada a um sofisticado procedimento de busca de parâmetros, essa metodologia é capaz de fornecer um modelo matemático robusto que descreva satisfatoriamente o cultivo de microalgas em fotobiorreatores fechados, sendo capaz de predizer comportamentos futuros com maior precisão.

1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um PBR em escala laboratorial visando um alto rendimento com relação à biomassa de *Poterioochromonas malhamensis* utilizando-se a TGS. Para tanto, uma série de etapas foram realizadas a partir dos seguintes objetivos específicos:

1. Projeto e construção de PBRs de placas planas e dos sistemas de gás e iluminação;

2. Aplicação da metodologia TGS ao processo de cultivo considerando-o um sistema dividido em 4 níveis hierárquicos:

Nível I – Estudo do PBR

2.1. Modelagem matemática da transferência de massa (TM) entre gás e líquido;

2.2. Estudo experimental da transferência de massa entre as fases líquida e gasosa por meio de um planejamento fatorial fracionado, avaliando-se 4 fatores (vazão de entrada de gás, fração de CO_2 no gás de entrada, concentração de antiespuma e salinidade do meio) e 3 níveis;

2.3. Modelagem matemática da fluidodinâmica dentro do PBR considerando-se sistema mono (líquido) e multifásico (líquido + gás);

2.4. Simulação do comportamento dos fluidos no PBR;

2.5. Avaliação da influência do módulo de dispersão de bolhas sobre o crescimento celular;

Nível II – Estudo da cepa

2.6. Estudo da tolerância da cepa *Poterioochromonas malhamensis* aos parâmetros operacionais e condições do sistema;

2.7. Otimização do meio de cultivo para a *Poterioochromonas malhamensis* a partir da sua composição elementar utilizando-se programação matemática linear (PML);

2.8. Avaliação dos meios otimizados com relação ao crescimento celular e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides presentes nas células;

2.9. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio com relação ao crescimento celular e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides presentes nas células;

Nível III – Modelagem matemática da cinética de crescimento microalgal

2.10. Descrição dos modelos matemáticos de crescimento celular relacionados às principais variáveis manipuláveis do sistema;

2.11. Desenvolvimento dos balanços de massa em sistema descontínuo, a partir do estudo da especiação do CO_2 em água, das definições de conversão e de velocidade específica de transformação e da Lei de Henry;

Nível IV – Combinação do conhecimento obtido nos demais níveis

2.12. Cultivo em sistema fechado em PBR de 10 L;

2.13. Proposta de um modelo complexo capaz de descrever o processo de produção de microalgas em PBR de placas planas;

2.14. Estimação de parâmetros cinéticos e estequiométricos a partir de um algoritmo baseado em Algoritmo Genético, implementado no software Maple®.

1.3 Justificativa

O cultivo de microalgas é intensamente estudado pois elas utilizam o CO_2 como fonte de carbono para o metabolismo celular, além de sua biomassa apresentar-se como uma matéria-prima potencial para a produção de biocombustíveis, além de diversos compostos com elevado valor agregado, como por exemplo pigmentos, cosméticos, medicamentos e compostos biologicamente ativos. Adicionalmente, as microalgas são uma fonte mais interessante que as plantas superiores para a produção de biocombustíveis, pois elas atingem eficiência fotossintética maior, não ocupam áreas de terra produtiva, o que não causa

competição com a produção alimentícia, e podem fornecer matéria-prima o ano todo. Apesar disto, embora a produção de microalgas seja rentável, ainda não existem tecnologias que possibilitem competir economicamente com os combustíveis de origem fóssil.

Neste contexto, o desenvolvimento de reatores capazes de fornecer alto rendimento com baixo custo mostra-se como objetivo principal dos estudos acerca de cultivo de microalgas em escala laboratorial. Como o processo de cultivo de microalgas em PBR é bastante complexo e interdisciplinar, se faz necessária a aplicação de técnicas sofisticadas para a predição de seu comportamento e consequente otimização do sistema.

A TGS surge como uma metodologia interessante para auxiliar no processo de modelagem da cinética do cultivo de microalgas aliada à sua fisiologia. Como resultado da modelagem matemática é possível propor um modelo simplificado, incluindo a cinética e a fisiologia algal, bem como as características de transferência de massa e hidrodinâmica do PBR. Logo, a pesquisa justifica-se pela necessidade de um processo eficiente de cultivo de microalgas diante da necessidade ambiental em que ele se encontra atualmente.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 - Fundamentação teórica

2.1 Microalgas: definição e fisiologia

As algas são definidas por ficologistas como sendo qualquer organismo que contenha clorofila-a e um talo não diferenciado em raízes, caule e folhas (CROFT *et al.*, 2006; LEE, 2008). De acordo com Bicudo e Menezes (2006), entre as algas estão desde organismos morfologicamente muito simples, até os vareques, gigantescas formas habitantes dos mares frios. Dentro deste contexto, as microalgas nada mais são que algas microscópicas presentes tanto em ambientes marinhos como em água doce.

Entre as microalgas estão microrganismos procariotos e eucariotos fotossintetizantes, sendo a maioria fitoplanctônica (LEE, 2008). Elas apresentam uma variedade de tamanhos que abrange de 2 a 200 μm (BARSANTI & GUALTIERI, 2006). É estimada a existência de 2.10^5 a 8.10^5 espécies de microalgas com variadas composições bioquímicas (RATHA & PRASANNA, 2012), sendo milhares mantidas em bancos de cepas e apenas algumas cultivadas em escala industrial (PARMAR *et al*., 2011). De acordo com sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular, as quatro classes mais importantes de microalgas (OHSE *et al*., 2007) em termos de abundância são:

- Algas verdes (Chlorophyceae): bastante abundantes, principalmente em água doce, são a origem dos vegetais superiores; têm o amido como o principal composto de estoque, porém podem produzir lipídeos sob determinadas condições;
- Diatomáceas (Bacillariophyceae): dominam o fitoplâncton dos oceanos e são encontradas também em águas doce e salobra. Estocam carbono na forma de lipídeos ou carboidratos;
- Cianobactérias (Cyanophyceae): morfologicamente próximas às bactérias e desempenham um papel fundamental na fixação de nitrogênio atmosférico;
- Algas pardas (Chrysophyceae): similares às diatomáceas com relação à pigmentação e composição bioquímica, apresentam coloração amarela, marrom e alaranjada, sendo encontradas principalmente em água doce. Como estoque, produzem lipídeos e carboidratos.

A principal via de produção de alimentos pelas algas é a fotossíntese, processo que sintetiza metabólitos essenciais a partir de substâncias químicas relativamente simples (CO_2) e energia luminosa (BICUDO e MENEZES, 2006).

A biomassa de microalgas é composta por carboidratos, proteínas e lipídeos que variam quantitativamente e qualitativamente de acordo com a espécie (ARREDONDO-VEGA & VOLTOLINA, 2007). A Tabela 2.1 apresenta a composição química típica de diferentes espécies de microalgas de água doce e marinha.

Tabela 2.1 – Composição química em peso seco total (%) de algumas microalgas

Espécie	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)
Scenedesmus obliquous	50-56	10-17	12-14
Scenedesmus dimorphus	8-18	21-52	16-40
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22
Euglena gracilis	39-61	14-18	14-20
Spirulina platensis	46-63	8-14	4-9
Spirulina máxima	60-71	13-16	6-7

Fonte: Adaptado de Arredondo-Vega e Voltolina (2007)

2.1.1 Fotossíntese oxigênica

As microalgas possuem um mecanismo fotossintético muito similar ao de vegetais superiores (vegetais com proteção do embrião), convertendo água e CO_2 em biomassa e O_2. Contudo, convertem a energia solar mais eficientemente por possuírem uma estrutura celular simples. Além de água, CO_2 e outros nutrientes ficam mais facilmente disponíveis devido ao fato de as microalgas crescerem suspensos em meio líquido (LOURENÇO, 2006).

Em cultivos fotoautotróficos, as microalgas utilizam energia luminosa e compostos inorgânicos para produzir compostos orgânicos, em um processo denominado fotossíntese oxigênica. Segundo Richmond (2004) todas as formas de vida na Terra dependem direta ou indiretamente da fotossíntese como forma de obtenção de energia para seu metabolismo e crescimento.

O processo fotossintético ocorre em duas etapas (Figura 2.1), sendo a primeira dependente da luz (fase luminosa), enquanto a segunda, chamada de Ciclo de Calvin-Benson, ocorre no escuro (fase química). Na fase luminosa ocorre a captura e

armazenamento da energia luminosa e sua posterior conversão nas moléculas energéticas nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato ($NADPH_2$) e adenosina trifosfato (ATP). Este potencial químico é consumido durante a fase química, que o utiliza para fixar e reduzir carbono inorgânico em triose fosfatos (BARSANTI & GUALTIERI, 2006). Em organismos eucariotos fotossintéticos a fotossíntese ocorre dentro do cloroplasto.

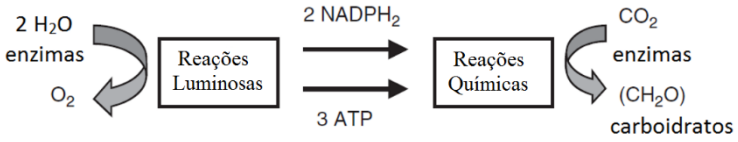

Figura 2.1 – Esquema geral da fotossíntese oxigênica
Fonte: Adaptado de Richmond (2004)

2.1.1.1 Estrutura dos cloroplastos

Células típicas de vegetais, os cloroplastos são organelas de forma discoide, com diâmetro médio variando entre 4 e 6 µm, sendo responsáveis pela absorção da luz e sua conversão em energia e compostos orgânicos durante o processo de fotossíntese (ROBERTIS *et al.*, 1985). A estrutura dos cloroplastos pode ser dividida em três componentes: (i) o envoltório, constituído por duas membranas pelas quais ocorrem os intercâmbios moleculares com o citosol; (ii) o estroma, constituído principalmente por proteínas, onde ocorre a fixação do CO_2, ou seja, a síntese de carboidratos; e (iii) os tilacóides, sacos achatados agrupados em pilhas, sendo cada pilha chamada de *granum*, onde ocorre a absorção e armazenamento da energia luminosa e sua conversão em ATP e $NADPH_2$.

2.1.1.2 Reações luminosas

Conforme apontado por Richmond (2004), as reações fotoquímicas ocorrem nas membranas dos tilacóides na presença de luz. Essas membranas possuem cinco complexos principais: antenas para absorção da luz (LHC I e LHC II); fotossistema I (PS I); fotossistema II (PS II); citocroma b_6/f e ATP sintase, conforme apresenta-se na Figura 2.2.

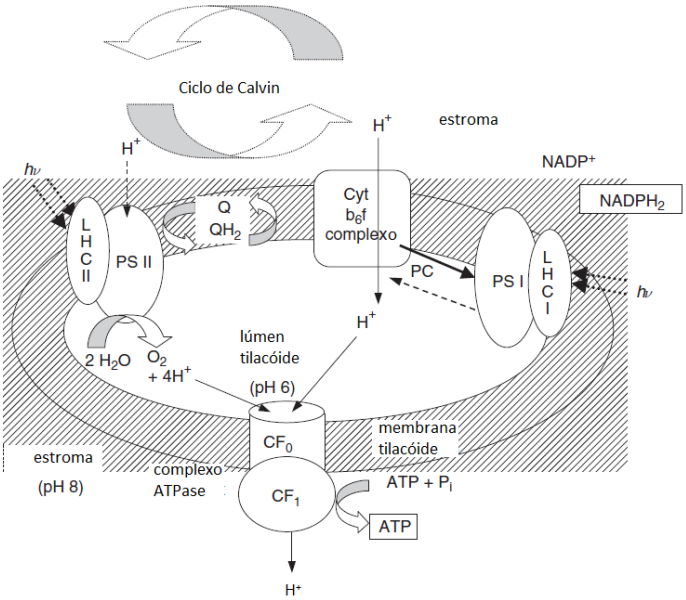

Figura 2.2 – Arranjo vetorial da fotossíntese na membrana do tilacóide
Fonte: Adaptado de Richmond (2004)

Os complexos fotossintetizantes operam em série, conectados por uma cadeia de transportadores de elétrons (CTE), e são normalmente visualizados como Esquema-Z (Figura 2.3). Com o intuito de produzir o redutor bioquímico ($NADPH_2$) e energia química (ATP), dois elétrons são extraídos da água em um processo altamente desfavorável, daí a necessidade de absorver a energia luminosa. Em se tratando da luz, não são todos os comprimentos de onda que podem ser absorvidos pelos pigmentos das microalgas. Neste contexto, existe a radiação fotossinteticamente disponível (RFD), que representa a região de 400 a 700 nm, totalizando de 45 a 50% do total de radiação que atinge a superfície terrestre (KIRK, 1994).

No Complexo PSII (ver Figura 2.2 e Figura 2.3), uma molécula de água é quebrada em um complexo de manganês (Complexo Produtor de Oxigênio - CPO), liberando O_2 e H^+ para o lúmen tilacóide, aumentando o gradiente de pH entre o tilacóide e o estroma, e elétrons para o complexo CPO. A partir daí os elétrons são transportados por 4 íons manganês (Mn) até a tirosina (Tyr_Z), que os envia até o pigmento clorofila, chamado de P680. Após receber os elétrons, o P680 é reduzido, ficando em uma condição estável. Até este ponto, todas as etapas ocorrem com redução da energia sendo, portanto, espontâneas. Já para que ocorra a oxidação do P680 precisa-se de energia, que é obtida da luz (*hv*) no comprimento de onda de 680 nm (daí o nome P680). Com a absorção de luz o complexo P680 fica em estado excitado (P680*), liberando os elétrons que são capturados pela feofitina (Pheo).

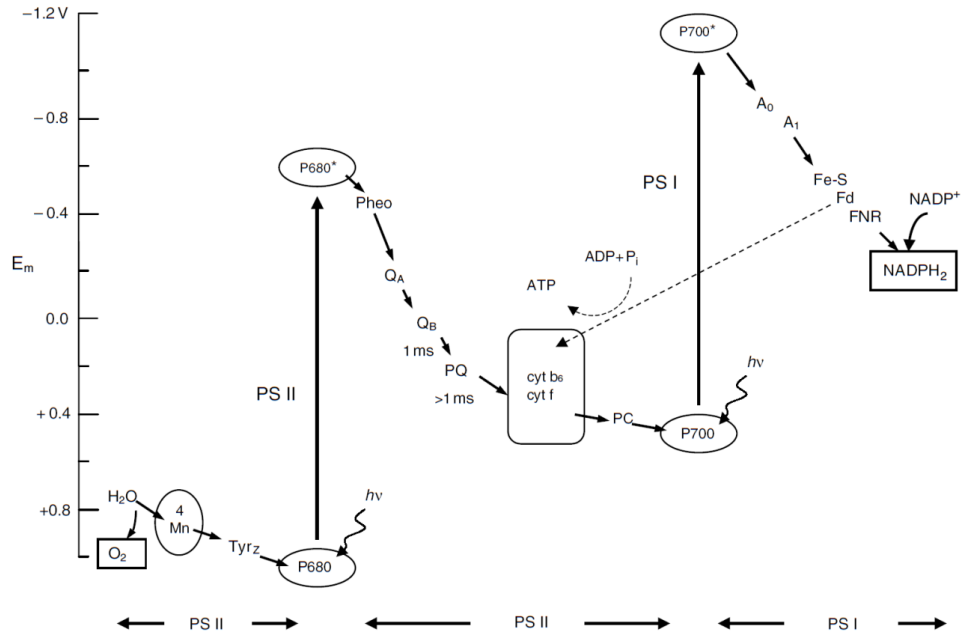

Figura 2.3 – Esquema-Z do transporte de energia (Em) desde elétrons da água ao $NADPH_2$.
Fonte: Adaptado de Richmond (2004)

A Pheo reduz o receptor primário Q_A, que é uma molécula de plastoquinona ligada a uma proteína. A plastoquinona bombeia elétrons do estroma para o tilacóide, o que também contribui para o gradiente de pH. Sequencialmente, dois elétrons são transferidos para o segundo receptor, Q_B. A plastoquinona reduzida é oxidada pelo complexo cyt b_6/f. A plastocianina (PC) transporta os elétrons ao centro de reação do PSI, P700, que da mesma forma que o P680, absorve energia luminosa até chegar ao seu estado excitado e liberar elétrons, que são transportados por uma série de portadores até serem capturados pela ferrodoxina, resultando na redução do $NADP^+$. Essa redução ocorre no estroma, contribuindo para o gradiente de pH entre o tilacóide e o estroma.

Como o lúmen tilacóide possui uma quantidade muito maior de prótons, esses fluem espontaneamente para o estroma através do canal chamado de CF_0 e CF_1 (ver Figura 2.2). Esse fluxo libera a energia necessária para a fosforilação do ADP em ATP que ocorre durante a fosforilação cíclica (linha pontilhada na Figura 2.3).

2.1.1.3 Reações químicas

A fixação do CO_2 ocorre durante as reações químicas (não dependentes da luz), utilizando o $NADPH_2$ e o ATP produzidos na fase luminosa. Para cada molécula de CO_2 fixada, são necessárias duas moléculas de $NADPH_2$ e três moléculas de ATP, conforme

apresentado na Equação 2.1. Segundo Richmond (2004) são necessários 10 quanta de luz absorvida para cada molécula de CO_2 assimilada. A conversão de CO_2 em açúcar ocorre em quatro etapas que formam o ciclo de Calvin-Benson (Figura 2.4).

$$CO_2 + 4H^+ + 4e^- \xrightarrow[enzimas]{2\ NADPH_2,\ 3\ ATP} (CH_2O) + H_2O \quad \underset{Carboidratos}{} \tag{2.1}$$

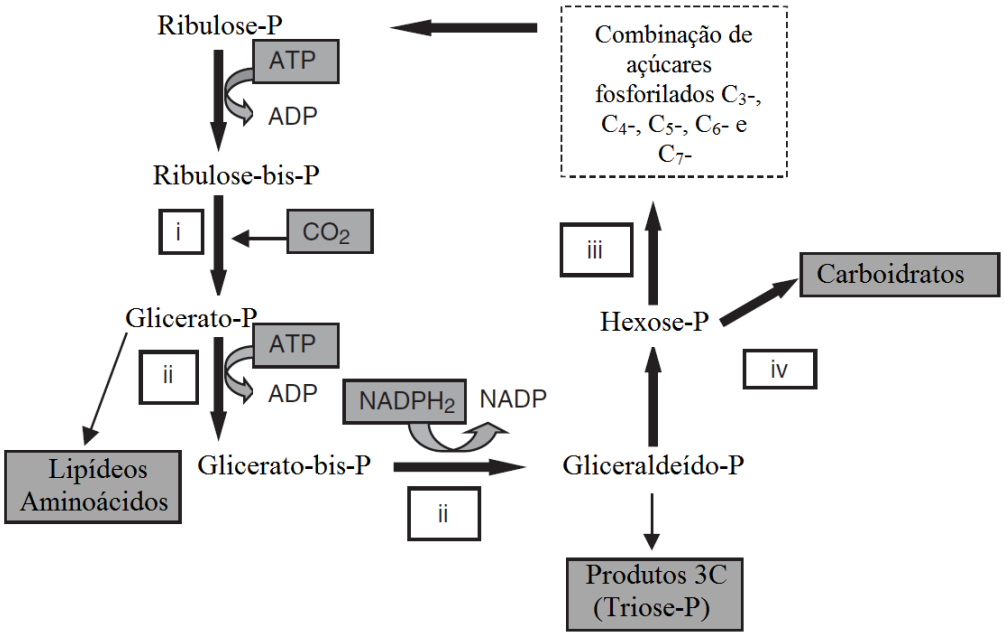

Figura 2.4 – Reações do ciclo de Calvin-Benson
Fonte: Adaptado de Richmond (2004)

- Fase I – Na carboxilação o CO_2 é adicionado ao açúcar de 5 carbonos, ribulose bisfosfato (Ribulose-bis-P), para formar duas moléculas de fosfoglicerato (Glicerato-P). Essa reação é catalisada pela enzima ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenasse (Rubisco).
- Fase II – Na redução ocorre a conversão do fosfoglicerato em produtos 3C (Triose-P), sendo a energia adicionada na forma de ATP e $NADPH_2$. Isso ocorre em dois passos: a fosforilação do Glicerato-P para formar difosfoglicerato (Glicerato-bis-P) e ADP; e a redução do Glicerato-bis-P em fosfogliceraldeído (Glycelardehyde-P) pelo $NADPH_2$.
- Fase III – Na regeneração ribulose fosfato (Ribulose-P) é regenerada em uma série complexa de reações combinando açúcares fosfatos de 3, 4, 5, 6 e 7 carbonos. As

enzimas transketolase e aldolase são responsáveis por produzir açúcares com 5 carbonos a partir de açúcares com 3 e 6 carbonos.

- Fase IV – Na produção os carboidratos são considerados como os produtos primários da fotossíntese, porém ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos também podem ser sintetizados na fixação fotossintética do CO_2. Nesta fase, os diversos produtos podem ser formados em função de diferentes condições de intensidade luminosa, concentração de CO_2, O_2 e nutrição.

2.2 Cultivo de microalgas

A dificuldade de otimização do cultivo de microalgas está nas correlações entre os inúmeros parâmetros de operação do sistema que devem ser cuidadosamente analisados como condições de cultivo. A influência de fatores físicos e químicos na composição e cultivo de microalgas deve ser analisada com cautela. Sabe-se que a luz é o fator que mais impacta na composição de microalgas em cultivo fotoautotrófico, porém, apenas quando as necessidades nutricionais forem satisfeitas e a temperatura estiver na região ótima, é possível atingir produtividade máxima. Além disso, o projeto de fotobiorreatores combinados com determinadas estratégias de cultivo também influenciam fortemente no resultado de produtividade da biomassa. Vonshak e Torzillo (2004) afirmam que as condições devem ser otimizadas de acordo com os produtos de interesse, pois geralmente aquelas que favorecem a formação de produtos desejados não são as mesmas requeridas ao máximo crescimento da biomassa.

2.2.1 Condições de cultivo

Quando comparadas com cultivos terrestres, as microalgas possuem requisitos básicos, porém que variam significativamente entre as espécies. De acordo com Illman *et al*. (2000), alterações nas condições de cultivo influenciam não apenas a taxa de crescimento, mas também a composição celular em quantidade e qualidade dos produtos formados. Assim, tais condições podem ser manipuladas com o objetivo de otimizar a taxa de produção de biomassa, aumentar o teor de lipídios intracelulares, facilitar a colheita e os processos de

separação e purificação (*downstream*), ou otimizar a produção de algum composto (TREDICI, 2010, CHAICHALERM *et al*., 2012).

Conforme abordado por diversos autores (ANDERSEN, 2005; KUMAR *et al.*, 2010, MATA *et al*., 2010), alguns dos principais fatores que influenciam o crescimento de microalgas são: iluminação, temperatura, agitação, pH, características qualitativas e quantitativas de nutrientes, salinidade, concentração de OD, CO_2, e de compostos tóxicos, como alguns metais pesados. Além destes, existem alguns fatores biológicos que influenciam no crescimento (KUMAR *et al*., 2011), tais como a presença de predadores, vírus, competidores, entre outros.

2.2.1.1 Iluminação

A fonte e a intensidade da energia luminosa incidente em cultivos de microalgas são fundamentais ao crescimento celular, tanto em função do intervalo de radiação fotossinteticamente disponível, quanto pelo regime de fotoperíodo que define os intervalos claro:escuro. Alguns autores observaram maior crescimento celular pela exposição de certas espécies à iluminação constante (DERNER *et al*., 1994; DERNER, 1995), apesar de existir relatos sobre essa condição ser letal para outras espécies (ANDERSEN, 2005). Em geral, os cultivos em escala laboratorial são irradiados continuamente ou sob os regimes claro:escuro de 12:12; 14:10; 16:8 (h:h), dentre outros.

As necessidades de intensidade da luz podem variar durante o cultivo de acordo com alterações na concentração celular, uma vez que quanto maior a concentração celular, menor é a profundidade de alcance da luz no meio, demandando maior intensidade luminosa (FAO, 2009). Entretanto, o crescimento microalgal pode ser limitado tanto pela baixa incidência de luz, quando inibida pelo seu excesso (RICHMOND, 2000). Assim, a fotolimitação representa uma das questões mais preocupantes na produção de microalgas em culturas de alta densidade, devido ao sombreamento que as células presentes na superfície provocam nas células que se encontram no interior do reator (FABREGAS *et al*., 2001). Diante desta iluminação limitada, as células aumentam a produção de pigmentos com o intuito de absorver a maior quantidade de luz possível (FABREGAS *et al*., 2001).

Por outro lado, a exposição prolongada das microalgas à energia luminosa de alta intensidade, e portanto à absorção de luz em excesso (VONSHAK, 1997; KARP, 2005), pode provocar o efeito de fotoinibição do crescimento celular (CHISTI, 2007), em virtude

da superexcitação dos centros reacionais fotossintéticos (PSI e PSII, ver Figura 2.2 e Figura 2.3), cujos danos são normalmente reversíveis.

Uma vez que a taxa de crescimento celular também é alterada pelo período de irradiação, estudos sugerem que o seu aumento pode ser favorecido pela utilização de luz pulsante, a qual reduz a respiração após o período de iluminação, e torna equilibrada a relação entre a produção de ATP e o ciclo de Calvin-Benson (FALKOWSKI & RAVEN, 2007). Neste sentido, a luz pulsante (*flashing light effect*) proporciona um período de irradiação reduzido, o que diminui a fotoinibição dos centros PSI e PSII, produzindo ATP suficiente para completar o processo de fotossíntese a partir do ciclo de Calvin-Benson, já que esta é a etapa mais demorada do processo.

2.2.1.2 Temperatura

A temperatura de cultivo apresenta grande influência na produção de biomassa, proteínas, lipídios e compostos fenólicos a partir de microalgas (COLLA et al., 2002), e deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos (LOURENÇO, 2006). Usualmente os cultivos suportam temperaturas entre 16 e 37°C, sofrendo redução de atividade abaixo de 16°C, e ocorrendo morte celular acima de 37°C (BARSANTI & GUALTIERI, 2006).

De acordo com Richmond *et al.* (1996), a influência na respiração celular durante a fase escura da fotossíntese é o efeito mais pronunciado da temperatura sobre o cultivo, sendo que nesta fase a taxa de respiração aumenta exponencialmente com a temperatura. Este aumento na taxa respiratória faz com que o fenômeno da perda noturna de biomassa diminua a produtividade do cultivo, podendo ultrapassar 35% de redução (OGBONNA & TANAKA, 2000), o qual pode ser minimizado pela diminuição da temperatura e controle de agitação do cultivo durante a noite. Por outro lado, pesquisas mostram que a diminuição da temperatura abaixo do nível ótimo geralmente aumenta o grau de insaturação de lipídios nas membranas. Outros estudos relatam o efeito da temperatura na produção de enzimas, pigmentos, nas quotas de carbono e nitrogênio nas células e no volume celular (VONSHAK & TORZILLO, 2004).

Além disso, a temperatura influencia fortemente na solubilidade dos gases, tendo papel importante na disponibilidade de CO_2 no meio de cultura. De acordo com Poling e colaboradores (2004), a solubilidade dos gases diminui com o aumento da temperatura para

os solventes mais comumente utilizados, como a água, por exemplo. Em 2008, Al-Anezi e colaboradores estudaram a solubilidade do CO_2 em função da temperatura, mostrando que um aumento na temperatura de 20 para 40 °C provocou uma diminuição na solubilidade do gás de 900 para 600 ppm, aproximadamente.

2.2.1.3 Dissociação de macronutrientes

As espécies dissociadas que devem ser consideradas no procedimento de modelagem de cultivo de microalgas é fortemente dependente da situação estudada. Por exemplo, quando o gás injetado é proveniente de descarte industrial, o chamado gás de combustão, os óxidos de nitrogênio e enxofre devem ser considerados, por apresentarem altas concentrações no gás. Em se tratando da água utilizada para o preparo do meio de cultivo, esta pode conter altas concentrações de diferentes espécies, como cálcio, fósforo, magnésio, potássio ou cloro. Além disso, algumas espécies podem interagir entre si, como por exemplo, na formação de carbonato de cálcio recalcitrante ($Ca^{2+} + CO_3^{2-} \leftrightarrow CaCO_3$), associado à calcificação induzida pelas microalgas (Scheufele *et al*., 2018). Desta forma, as equações de dissociação das principais espécies importantes para o cultivo de microalgas estão apresentadas na Tabela 2.2.

A maximização da difusão do CO_2 para o meio líquido representa um dos objetivos fundamentais do projeto de sistemas de cultivos de microalgas, pois o carbono representa cerca de 50% da biomassa microalgal (CHISTI, 2007). Para a determinação da solubilidade do CO_2 devem ser considerados tanto o equilíbrio gás-líquido, quanto as reações de dissociação do CO_2.

Admitindo-se a reação genérica dada pela Equação 2.2, na qual não se considera as espécies sólidas ou líquidas, pois as concentrações em quantidade de matéria não podem sofrer variações neste sistema, as constantes de equilíbrio iônico (K) são construídas com base no conceito de equilíbrio químico, conforme as Equações 2.3 e 2.4.

$$aA + bB \underset{\leftrightarrow}{K_f} cC + dD \tag{2.2}$$

$$K_f = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \tag{2.3}$$

$$K_f = \frac{1}{K_b} \tag{2.4}$$

O equilíbrio iônico da água ocorre quando ela mesma se dissocia, formando os íons hidrônio (H^+) e hidróxido (OH^-), conforme a Equação 2.5.

$$H_2O \overset{K_w}{\leftrightarrow} H^+ + OH^- \tag{2.5}$$

Considerando-se o equilíbrio químico (Equação 2.2) e iônico (Equação 2.5), e a relação entre o valor pH e a concentração de íons H^+ (Equação 2.6); e admitindo-se que a água não apresenta excesso de íons positivos ou negativos (pH igual a 7), a constante de equilíbrio da água (K_w) é determinado pela Equação 2.7.

$$pH = -log([H^+]) \tag{2.6}$$

$$K_w = [H^+][OH^-] = 10^{-14} \tag{2.7}$$

As reações de dissociação (Equações 2.8 a 2.10) e de equilíbrio (Equações 2.11 e 2.12) do CO_2 em água determinam a forma química na qual o carbono inorgânico está presente no meio reacional (dióxido de carbono – CO_2; ácido carbônico – HCO_3^- e carbonato – CO_3^{2-}). O mesmo ocorre para o enxofre (Equações 2.13 a 2.17), nitrogênio (Equações 2.18 a 2.22), fósforo (Equações 2.23 e 2.24), cálcio (Equações 2.25 e 2.26) e magnésio (Equações 2.27 e 2.28).

Tabela 2.2 – Equações de dissociação e equilíbrio das espécies dissolvidas

Equações	n° Equação
Dióxido de carbono	
$CO_{2(aq)} + H_2O \underset{kb1}{\overset{k_{f1}}{\longleftrightarrow}} HCO_3^- + H^+$	(2.8)
$HCO_3^- \underset{kb2}{\overset{k_{f2}}{\longleftrightarrow}} CO_3^{2-} + H^+$	(2.9)
$CO_{2(aq)} + OH^- \underset{kb3}{\overset{k_{f3}}{\longleftrightarrow}} HCO_3^-$	(2.10)
$CO_{2(aq)} + H_2O \overset{K_1}{\leftrightarrow} H_2CO_3 \overset{K_1}{\leftrightarrow} HCO_3^- + H^+$	(2.11)
$HCO_3^- \overset{K_2}{\leftrightarrow} + H^+ + [CO_3^{2-}]$	(2.12)
Dióxido de enxofre	
$SO_{2(aq)} + H_2O \underset{kbS1}{\overset{k_{fS1}}{\longleftrightarrow}} HSO_3^- + H^+$	(2.13)
$HSO_3^- \underset{kbS2}{\overset{k_{fS2}}{\longleftrightarrow}} SO_3^{2-} + H^+$	(2.14)
$SO_{2(aq)} + OH^- \underset{kbS3}{\overset{k_{fS3}}{\longleftrightarrow}} HSO_3^-$	(2.15)
$SO_{2(aq)} + H_2O \overset{K_{S1}}{\leftrightarrow} H_2SO_3 \overset{K_{S1}}{\leftrightarrow} HSO_3^- + H^+$	(2.16)
$HSO_3^- \overset{K_{S2}}{\leftrightarrow} SO_3^{2-} + H^+$	(2.17)
Óxido de Nitrogênio	
$NO_{(aq)} + H_2O \overset{K_{N1}}{\leftrightarrow} HNO_2$	(2.18)
$2NO_{2(aq)} + H_2O \overset{K_{N2}}{\leftrightarrow} HNO_2 + HNO_3$	(2.19)
$3HNO_2 \overset{K_{N3}}{\leftrightarrow} HNO_3 + 2NO_{(aq)} + H_2O$	(2.20)
$HNO_2 \underset{kbN1}{\overset{k_{fN1}}{\longleftrightarrow}} NO_2^- + H^+$	(2.21)
$HNO_3 \underset{kbN2}{\overset{k_{fN2}}{\longleftrightarrow}} NO_3^- + H^+$	(2.22)
Ácido fosfórico	
$H_3PO_4 \overset{K_{P1}}{\leftrightarrow} H_2PO_4^- + H^+$	(2.23)
$H_2PO_4^- \overset{K_{P2}}{\leftrightarrow} HPO_4^{2-} \overset{K_{P2}}{\leftrightarrow} PO_4^{3-} + H^+$	(2.24)
Cálcio	
$Ca^{2+} + H_2O \overset{K_{Ca1}}{\leftrightarrow} CaOH^+ + H^+$	(2.25)
$CaOH^+ + H_2O \overset{K_{Ca2}}{\leftrightarrow} Ca(OH)_{2,aq} + H^+$	(2.26)
Magnésio	
$Mg^{2+} + H_2O \overset{K_{Mg1}}{\leftrightarrow} MgOH^+ + H^+$	(2.27)
$MgOH^+ + H_2O \overset{K_{Mg2}}{\leftrightarrow} Mg(OH)_{2,aq} + H^+$	(2.28)

K – Constante de equilíbrio; k – Constante cinética de dissociação

2.2.1.3.1 Equilíbrio gás-líquido

As concentrações de gases CO_2 e O_2 dissolvidos no equilíbrio podem ser calculadas a partir da Lei de Henry (Equação 2.29), sendo diretamente proporcional à pressão parcial da espécie no gás – p_g (Equação 2.30), à temperatura e à salinidade (SCHMIDELL *et al*., 2001) por meio da constante de proporcionalidade de Henry – K_H.

$$C^{eq} = K_H p^g \tag{2.29}$$

$$p^g = x_g P \tag{2.30}$$

sendo C^{eq} a concentração de gás na fase líquida na saturação (g m^{-3}); K_H a constante de Henry (g m^{-3} atm^{-1}); p^g a pressão parcial de gás na fase gasosa (atm); x_g a fração volumétrica da espécie desejada no gás e P a pressão total do gás (atm).

2.2.1.5 Concentração de O_2

Em altas razões O_2/CO_2 a enzima Rubisco atua como oxigenase, catalisando a reação de conversão do carbono orgânico em CO_2 sem ganho metabólico, em um processo chamado de fotorrespiração. Isso ocorre, pois a enzima Rubisco possui baixa afinidade com o CO_2, sendo o seu K_m (coeficiente de meia saturação) muito próximo ao nível de CO_2 no ar (RICHMOND, 2004). Durante a fotorrespiração, o O_2 reage com a ribulose bifosfato para formar o fosfoglicolato. Depois da defosforilação, o glicolato é convertido em serina, amônia e CO_2 em um processo com várias etapas. A reação de fotossíntese produz o O_2 a partir da quebra da molécula de H_2O, aumentando a sua concentração no meio (ver Figura 2.1). Assim, é necessária a remoção contínua de OD de fotobiorreatores (MOLINA *et al*., 2001). Segundo Chisti (2007) o nível máximo de OD tolerável a fim de evitarem-se os danos às microalgas é de 400% do valor de saturação do ar.

2.2.1.6 Potencial hidrogeniônico – pH

O pH possui efeito significativo sobre o crescimento celular (KROUMOV *et al*., 2016), devido à sua influência sobre o equilíbrio do CO_2 em água (Figura 2.5). De acordo com Lopes (2007), existem três vias de utilização de carbono inorgânico pelas células de microalgas, sendo elas:

- Assimilação direta do CO_2 através da membrana plasmática;
- Utilização de bicarbonato pela indução da enzima anidrase carbônica, que converte íons HCO_3^- em CO_2;
- Transporte de bicarbonato diretamente através da membrana plasmática.

O fato de o CO_2 ser difundido rapidamente para o interior das células e ser fixado diretamente pela enzima Rubisco caracteriza esta espécie como preferencial para o processo de fotossíntese na maioria das microalgas. Já o bicarbonato pode ou não ser absorvido pelas células por difusão, porém ele deve ser convertido em CO_2 para a sua utilização pela enzima Rubisco, gerando um gasto energético maior para o processo.

O pH do meio deve estar entre 6 e 10, uma vez que as concentrações da forma mais facilmente assimilável pelas microalgas – bicarbonato, são mantidas nessa região de pH. Além disso, segundo Arredondo-Vega e Voltolina (2007), a solubilidade dos minerais também é determinada pelo pH do meio, indicando a sua influência direta e indireta no metabolismo das microalgas.

A remoção do CO_2 do meio provoca o aumento do pH, o que limita a quantidade de carbono e outros nutrientes disponíveis para as células, bem como diminui o crescimento algal por interrupção dos processos celulares (SILVA *et al.*, 2004). Para contornar este problema, Babcock *et al*. (2002) propuseram o controle do uso do CO_2, já que este acidifica o meio de cultura.

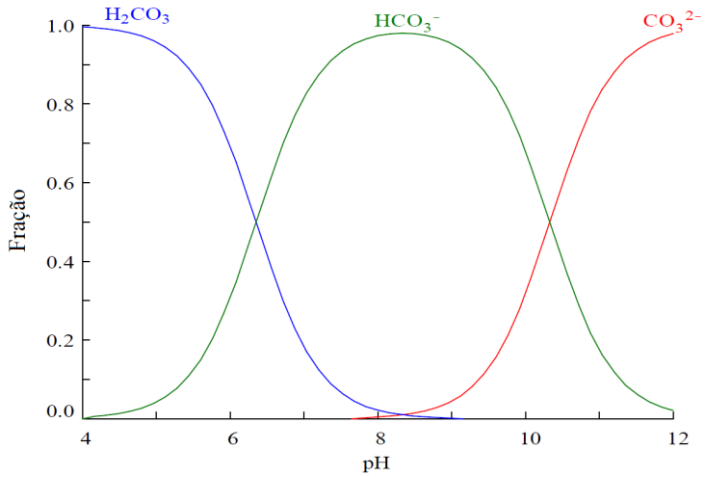

Figura 2.5 – Espécies de carbono inorgânico dissolvido em água em função do pH
Fonte: O autor

2.2.1.7 Agitação

Uma adequada homogeneização do meio assegura iluminação a todas as células; previne a sedimentação de células; ajuda no controle da temperatura e pH; e garantem ideais trocas gasosas ao longo do cultivo evitando o surgimento de zonas anóxicas (RICHMOND, 2004; ANDERSEN, 2005). Por outro lado, uma agitação exagerada resulta em choque entre as células, provocando tensão de cisalhamento e comprometendo o cultivo por danificar a parede celular. O borbulhamento de ar consiste em uma das formas de se promover a boa mistura do meio (KUMAR *et al*., 2010), além de servir como fonte de CO_2; evitar o gradiente de nutrientes e o auto sombreamento; e promover o controle do pH pela adição de CO_2.

2.2.1.8 Composição nutricional do meio de cultivo

Uma adequada constituição do meio de cultivo proporciona os nutrientes necessários ao crescimento das microalgas, à manutenção das atividades, bem como à divisão celular (ZENG *et al*., 2011). A composição nutricional do meio, bem como as concentrações dos elementos, está vinculada à composição final da biomassa, tais como concentrações de lipídios, carboidratos, proteínas e/ou pigmentos (ARAVANTINOU, 2013).

Apesar da composição mineral de microalgas variar conforme a espécie (DIN & EL-SHERIF, 2012), existe um consenso sobre os principais elementos constituintes da matéria orgânica de microalgas, sendo eles: carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (O'KELLEY, 1968; DRAGONE *et al*., 2011). O carbono representa a maior demanda, uma vez que é o componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, constituindo cerca de 50% da biomassa microalgal (ABALDE *et al*., 1995; RICHMOND, 2004; LOURENÇO, 2006). Em seguida, o nitrogênio representa o nutriente crucial para o metabolismo celular, cuja limitação pode resultar na descoloração da célula e no acúmulo de carbono orgânico na forma de polissacarídeos e lipídeos (BECKER, 1994), consequência interessante nos casos em que o objetivo é produzir biodiesel.

Segundo Lourenço (2006) os macronutrientes: carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício e ferro, são cruciais na constituição da estrutura das biomoléculas, membranas e meio celular. Esses elementos regulam as atividades metabólicas e participam de processos de troca de energia. Os micronutrientes:

manganês, molibdênio, cobre, zinco, cobalto, boro, vanádio e selênio, participam da estruturação e da atividade de enzimas que são fundamentais ao cultivo.

Normalmente adicionadas em culturas densas (LOURENÇO, 2006), as vitaminas tiamina (B_1) e biotina (H) agem como coenzima e auxiliam o transporte de CO_2, respectivamente. O uso da cianocobalamina (B_{12}) também é favorável ao cultivo, apesar de sua função não ser elucidada. Além disso, quelantes são adicionados ao meio para promover a solubilidade de alguns componentes, sendo o EDTA o mais usual para microalgas.

2.2.2 Metabolismo celular

Dependendo da espécie, as microalgas possuem as seguintes vias de metabolização para o crescimento e manutenção celular: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Algumas microalgas utilizam apenas um tipo de metabolismo para promover o crescimento, já outras podem alternar entre essas rotas metabólicas, mas tendem a crescer melhor em uma delas (RADMER, 1996).

As reações metabólicas de células autotróficas ocorrem a partir de compostos inorgânicos (dióxido de carbono e sais), na presença ou ausência da energia luminosa (SIGEE, 2005; BRENNAN & OWENDE, 2010). Quando obrigatoriamente as microalgas precisam de energia luminosa para o uso das fontes inorgânicas (RICHMOND, 2004) são chamadas de microalgas fotoautotróficas. No metabolismo heterotrófico, o carbono orgânico é a única fonte de energia para as reações metabólicas (RICHMOND, 2004; MATA *et al*., 2010). As células fotoheterotróficas necessitam obrigatoriamente de energia luminosa para a utilização do carbono orgânico (RICHMOND, 2004). Já o metabolismo mixotrófico combina as rotas autotrófica e heterotrófica, dependendo da concentração dos compostos presentes no meio, e da intensidade da luz disponível (BRENNAN & OWENDE, 2010).

2.2.3 Regime de cultivo

São usuais os regimes de cultivo contínuos, semicontínuos e em batelada, além das culturas de células imobilizadas e recicladas (LEE & SHEN, 2004) que são realizadas para aplicações específicas. No regime batelada, as células são adicionadas em meio de cultivo fresco, não havendo adição de nutrientes após a inoculação. Este tipo de cultivo caracteriza

modificações intensas na composição do meio de cultura ao longo do processo pelo efeito de auto sombreamento das células (LEE & SHEN, 2004; LOURENÇO, 2006). Conforme se verifica na Figura 2.6, no regime batelada existem as etapas de crescimento bem definidas (RICHMOND, 2004), sendo que a fase *lag* ou de adaptação ocorre devido à presença de células inativas ou devido à adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo (1). Na fase exponencial ou logarítmica (2) se inicia o crescimento e a multiplicação, na qual a divisão ocorre como uma função exponencial do tempo. As etapas (3), (4) e (5) são, respectivamente, as fases de redução do crescimento ou de transição, fase estacionária e fase de declínio e morte.

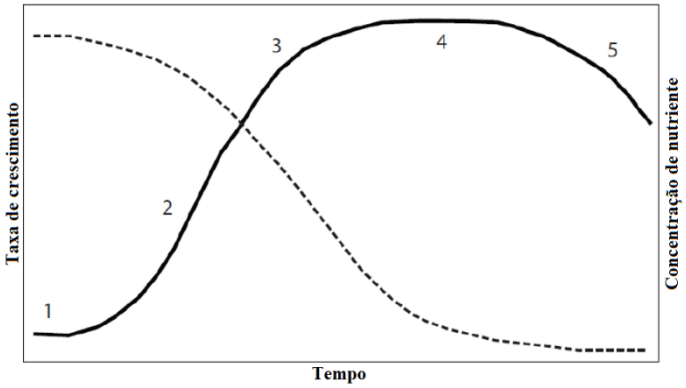

Figura 2.6 – Curvas de crescimento celular (—) e de consumo de nutrientes (---) em cultivo batelada
Fonte: Adaptado de Richmond, 2004

Este comportamento não é observado em cultivos de regime contínuo, nos quais a entrada de nutrientes e a saída de cultura com células de microalgas ocorrem permanentemente. Já nos cultivos semicontínuos ocorrem uma substituição de parte do meio em determinados intervalos de tempo, geralmente quando a quantidade de biomassa está alta. Nesse caso, a curva de crescimento típica apresenta variações bruscas na densidade de células.

2.2.4 Sistemas de cultivo

Existem diversas formas de cultivo que podem ser utilizados para a produção de microalgas, porém eles são essencialmente divididos em duas categorias: os sistemas abertos e os fechados. Nas últimas décadas, diversos estudos foram realizados com o intuito de desenvolver sistemas ótimos para a produção de microalgas (OSWALD, 1988;

RICHMOND, 1990; MOLINA GRIMA *et al*., 1995; TREDICI & ZITTELLI, 1998; MAZZUCA SOBCZUCK *et al*., 2000; PULZ, 2001; JANSSEN *et al*., 2003; UGWU *et al*., 2002; BARBOSA *et al*., 2003; HALL *et al*., 2003; LEBEAU & ROBERT, 2003; CHISTI, 2007; KUMAR *et al*., 2011; ZHAO *et al*., 2011; VASUMATHI *et al*., 2012).

2.2.4.1 Sistemas abertos

Os sistemas abertos são os mais utilizados industrialmente, pois apresentam fácil operação, baixo custo e simples construção (LEE & SHEN, 2004). Os tipos de sistemas abertos podem ser naturais ou artificiais. Dentre os naturais, estão os lagos e as lagoas, enquanto os artificiais podem ser circulares, inclinados, do tipo *raceway*, entre outros. As microalgas multiplicam-se com facilidade em corpos de água naturais, desde que estes contenham nutrientes adequados e em concentrações suficientes. De acordo com Tredici (2004), se o corpo de água possui características químicas específicas e pouca variação de temperatura, ele torna-se um PBR seletivo, podendo cultivar monoculturas.

Os PBRs do tipo *raceway*, chamados de lagoas intensivas, são canais de recirculação com ciclo fechado, normalmente ovais ou sinuosos, onde a agitação é realizada por uma roda de pás ou por aeração (Figura 2.7). Nesse sistema, a produção de microalgas pode ser até 10 vezes maior que em lagoas extensivas (DARZINS *et al.*, 2010).

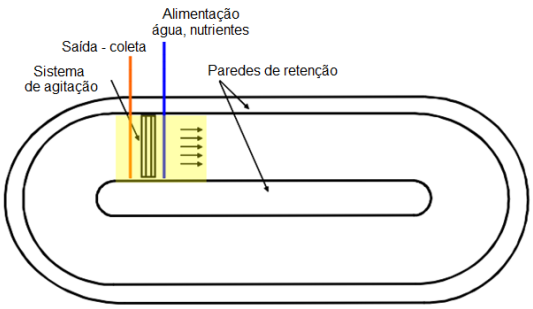

Figura 2.7 – Esquema típico de um reator do tipo *raceway*
Fonte: Darzins *et al*., (2010)

2.2.4.2 Sistemas fechados

A principal característica dos PBRs fechados é a possibilidade de maior controle dos parâmetros de operação. Dentre os tipos mais comuns estão os tubulares, de placas planas e coluna de bolhas. A Figura 2.8 apresenta um esquema típico de PBR tubular de aplicação

industrial, constituindo-se basicamente de um tubo estreito e longo, cujo diâmetro deve ser pequeno, para aumentar a área iluminada (A) com relação ao volume (V), caracterizando o parâmetro razão A/V. Para facilitar a adição de nutrientes, e a retirada de gás oxigênio produzido como resultado da fotossíntese, os tubos estreitos são acoplados a colunas de bolhas com diâmetro maior e a cultura é circulada entre o tubo e a coluna (CHISTI, 2001).

Os PBRs de placas planas são constituídos de placas planas de modo a maximizar a utilização da luz, sendo que as algas são cultivadas entre as placas (Figura 2.9). A injeção de ar é feita pela base do reator, com bolhas saindo de todo o seu comprimento, o que proporciona boas condições de mistura e troca gasosa (GROSS, 2013). Uma das vantagens desse tipo de PBR é a possibilidade de alcançar altas concentrações de biomassa e alto rendimento, aumentando a viabilidade da produção. Esse rendimento elevado se deve ao pequeno trajeto percorrido pela luz dentro do reator, de acordo com a distância entre as placas. Deve-se levar em conta que a diminuição dessa distância geralmente ocasiona aumento no rendimento do reator, porém diminui o volume produzido (RICHMOND & CHENG-WU, 2001).

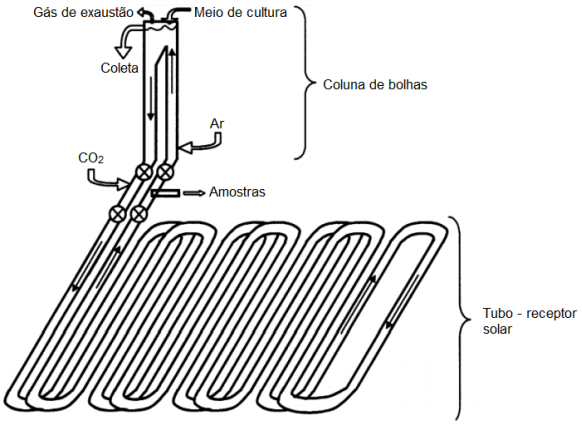

Figura 2.8 – Esquema de um PBR tubular
Fonte: Chisti (2001)

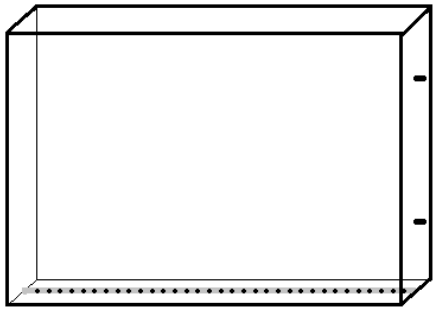

Figura 2.9 – Esquema de um PBR do tipo *flat plate*
Fonte: O autor

Quando comparado com PBRs tubulares de razões A/V similares, os de placas planas apresentam a vantagem de possuírem um trajeto menor para o oxigênio, evitando assim o seu acúmulo no interior do reator, e além disso eles podem ser facilmente inclinados para receberem a luz solar diretamente na sua superfície lateral, aumentando a produtividade (HU *et al*., 1998a).

2.3 Variáveis de projeto de fotobiorreatores fechados

Os efeitos dos seguintes parâmetros sobre o cultivo de microalgas: razão A/V; mistura do meio; transferência de massa; temperatura e material do reator, são frequentemente investigados no desenvolvimento de PBRs fechados.

2.3.1 Razão Área/Volume

A razão A/V determina a proporção do reator que recebe iluminação, cujos valores altos proporcionam altas concentrações de biomassa e produtividade do PBR, diminuindo custos de preparo do meio de cultivo e da separação da biomassa (TREDICI, 2004). Por outro lado, Burns (2014) aponta que valores demasiado altos para A/V podem causar mudanças na evolução do oxigênio, na absorção do CO_2, no esgotamento de nutrientes e na excreção de metabolitos. Além disso, o gasto energético com a mistura do PBR aumenta consideravelmente (DOGARIS *et al*., 2016), e pode se tornar inviável em escala industrial. Em 2013, Kroumov e colaboradores combinaram a razão A/V com a fisiologia de microalgas para prever a concentração de biomassa em um PBR. Embora a literatura sugira alguns valores ótimos para a razão A/V, esse parâmetro é altamente dependente da intensidade luminosa incidente na superfície do PBR.

2.3.2 Agitação

A turbulência e mistura de PBRs caracteriza três efeitos principais no sistema: a prevenção da sedimentação das células; a diminuição de gradientes nutricionais de CO_2 e O_2; e a movimentação das células através das regiões escuras e iluminadas dentro do reator

(GROBBELAAR, 2010). Essa movimentação garante que todas as células recebam energia luminosa suficiente para realizar a fotossíntese (JANSSEN *et al*., 2003), evitando assim o efeito do sombreamento verificado em cultivos com alta densidade celular (GAO *et al*., 2015). Por outro lado, se a mistura for muito intensa ela pode aumentar a tensão de cisalhamento a níveis prejudiciais, além de aumentar consideravelmente o gasto energético do sistema. Segundo Leupold e colaboradores (2013), o gasto com a mistura do sistema pode representar cerca de 50% do custo total de operação do PBR, e por isso, para definir condições experimentais viáveis, o balanço entre lucros e custos pode ser considerado em projeto de PBRs (GUO *et al*., 2015). No trabalho realizado por Qiang e Richmond (1996), os autores verificaram que um aumento na taxa de agitação de 0,6 a 4,2 L L^{-1} min^{-1} dobrou a produtividade da biomassa, porém, em 6,3 L L^{-1} min^{-1} foi prejudicial ao crescimento celular. Portanto, utilizar a abordaram da fluidodinâmica do reator e investigar os parâmetros de transferência de massa mostra-se importante para o projeto de PBRs eficientes (CAÑEDO & LIZÁRRAGA, 2016).

2.3.3 Troca gasosa

O controle da relação gasosa O_2:CO_2 é importante para o metabolismo celular, uma vez que O_2 em excesso faz com que a enzima Rubisco atue como oxigenase, utilizando o oxigênio para a fotorrespiração, sem fornecer CO_2 para o ciclo de Calvin-Benson (PULZ, 2001). Assim, durante o cultivo deve haver CO_2 dissolvido em quantidade suficiente, enquanto oxigênio dissolvido (OD) deve ser removido antes de atingir níveis inibitórios.

2.3.4 Controle da temperatura

A temperatura possui significativa influência sobre a taxa de crescimento específico e é altamente dependente da espécie de microalga. Temperaturas muito abaixo da faixa ótima de cultivo da microalga podem reduzir a taxa de crescimento, enquanto temperaturas muito elevadas podem gerar efeitos inibitórios. Assim, o controle da temperatura, seja por sombreamento, imersão em banho termostático e pulverização de água (TREDICI, 2004), tem sido amplamente considerado em projeto de PBRs.

2.3.5 Material de construção

Conforme apontado por Tredici (2004), o material de construção do PBR deve satisfazer algumas condições, sendo elas a não toxicidade, durabilidade, alta translucidez, força mecânica alta, estabilidade química, baixo custo e facilidade de limpeza.

2.4 Teoria Geral de Sistemas (TGS)

A TGS foi formulada com o intuito de desenvolver uma metodologia científica universal para resolver problemas complexos. Ela envolve subsistemas interdisciplinares relacionados entre si e com o ambiente, sendo a primeira proposta apresentada por Von Bertalanffy (1968), e discutida em mais detalhes em um trabalho posterior do mesmo autor (VON BERTALANFFY, 1969a e 1969b), onde é descrito o seu papel no estudo de organismos biológicos e sociais. Mais tarde, Zgurovsky e Pankratova (2007) apresentaram uma série de passos que possibilitaram a utilização da TGS por pesquisadores de diferentes áreas (física, química, biologia, sociologia, filosofia, entre outras), levando em consideração o conhecimento de especialistas multidisciplinares.

Os principais estágios da teoria aplicada à formulação de modelos fenomenológicos de biorreatores e otimização de bioprocessos (KAFFAROV *et al*., 1979; KAFFAROV *et al*., 1985) são:

- Determinação do critério de otimalidade do bio-processo;
- Análise qualitativa do sistema PBR decompondo-o em subsistemas; formulação e identificação paramétrica dos modelos dos subsistemas;
- Síntese do sistema a partir da formulação de complexos modelos dos subsistemas e suas inter-relações; simplificação e combinação de todos os modelos em único modelo fenomenológico;
- Solução da modelagem e verificação das variáveis de projeto fundamentais ao modelo fenomenológico complexo do PBR com base no critério de otimalidade escolhido; *scale up* do PBR com base no modelo desenvolvido.

2.4.1 TGS aplicada à modelagem da fixação do CO_2 por microalgas

Para o desenvolvimento eficiente e *scale up* de um PBR, a fisiologia e o metabolismo celular das microalgas, a composição do gás de combustão, a disponibilidade da irradiação luminosa e o projeto do PBR devem ser estudados em detalhes, e suas interações complexas devem ser entendidas. Neste contexto, o trabalho de Kroumov e colaboradores (2016) apresentou detalhadamente a aplicação da TGS ao processo de cultivo de microalgas em um PBR fechado.

Com a estruturação da TGS constrói-se o modelo complexo para um PBR, levando-se em consideração o conhecimento obtido com os estudos de subsistemas, tais como: o estudo da cinética microalgal; o estudo dos efeitos de parâmetros principais, como a irradiação luminosa; bem como as correlações entre os parâmetros sobre os processos de transferência de massa, principalmente a transferência do CO_2 da fase gasosa para a fase líquida e sua especiação. Finalmente, realiza-se a análise da fluidodinâmica computacional (FDC) para o projeto específico do PBR.

2.5 Transferência de massa

O estudo da TM entre o gás e o líquido é necessário para assegurar ou maximizar o fornecimento de CO_2 ao interior das células durante processo de fotossíntese. Conforme a exemplificação da Figura 2.10, apresentada por Schmidell *et al*., 2001, as diversas resistências possíveis à TM no trajeto são divididas em 3 grupos: a dissolução ou transferência do gás para o líquido (resistências 1 – difusão do CO_2 no filme estagnado na fase gasosa, 2 – transferência na interface gás-líquido e 3 – difusão do CO_2 no filme estagnado na fase líquida); a difusão do gás até as células (resistência 4); e a difusão ao interior das células (resistências 5, 6 e 7) e consumo do CO_2 (resistência 8). Sob a hipótese de mistura perfeita, a resistência 4 pode ser considerada desprezível, uma vez que o líquido está agitado para promover o transporte convectivo. A resistência 5, referente a película líquida estagnada em torno da célula, é desprezível devido à grande área superficial exposta ao líquido. Além disso, a agitação do sistema contribui para a diminuição da espessura da película. A resistência 6 imposta pela membrana celular pode ser desconsiderada, pois a absorção dos gases pela célula é realizada por transporte ativo. As resistências 7 e 8, que

respectivamente ocorrem durante o transporte no interior das células e no sítio de reação, são desprezíveis porque as células são muito pequenas e a reações ocorrem instantaneamente.

Sendo assim, a etapa que define o fornecimento de carbono inorgânico para o interior das células é a TM entre as fases gasosa e líquida, de acordo com as resistências 1, 2 e 3 (Figura 2.10).

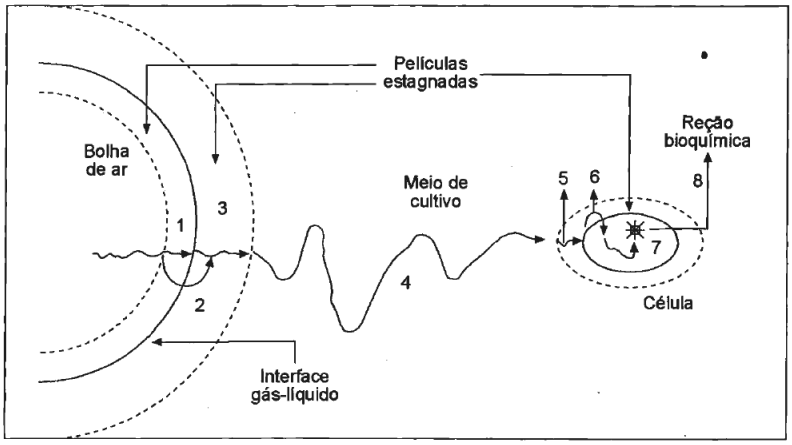

Figura 2.10 – Resistências associadas à dissolução e consumo de CO_2
Fonte: Adaptado de Schmidell *et al*., 2001

2.5.1 Teoria dos dois filmes estagnados

Considerando-se uma bolha de gás suspensa em um meio líquido, conforme proposto por Schmidell *et al*., 2001, supõe-se a existência de uma película gasosa estagnada entre o seio gasoso e a interface gás-líquido, onde se localiza a resistência ao transporte de gás (Figura 2.11). Essa resistência é caracterizada pelo inverso do coeficiente de transferência da película gasosa (k_g), definido pela relação entre a difusividade do gás e a espessura da película estagnada. Como a transferência ocorre apenas por efeito difusional, esta depende do gradiente entre a pressão parcial do gás no interior da bolha (p^g) e a pressão parcial na interface (p*). Mesmo que o efeito seja difusional, o modelo utilizado é análogo ao mecanismo convectivo, pois a espessura da película gasosa normalmente não é conhecida (Teoria da camada limite de concentração).

O mesmo raciocínio é aplicado para a fase líquida, onde a resistência ao transporte do gás caracteriza-se pelo inverso do coeficiente de transporte na película líquida (k_L). Neste

caso, o fluxo de gás depende da existência de gradiente entre a concentração de gás na interface C* e a concentração do gás no seio da fase líquida (C).

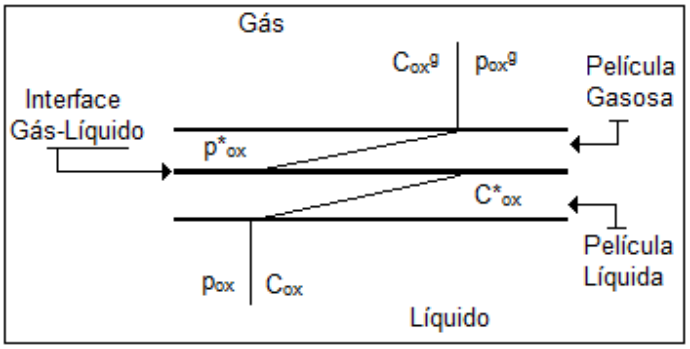

Figura 2.11 – Interface gás-líquido com as películas estagnadas
Fonte: Adaptado de Schmidell et al. (2001)

Sob a hipótese de estado estacionário, define-se o fluxo por unidade de área interfacial (n_g) como a razão entre gradientes e a resistências, apresentado na Equação 2.31. Considerando-se intensa movimentação das moléculas do gás, a resistência devido ao filme gasoso pode ser desprezível, sendo p^g=p* e C^g=C*, conforme a Equação 2.32.

$$n_g = k_g H(p^g - p^*) = k_L H(p^* - p) = k_g(C^g - C^*) = k_L(C^* - C) \quad (2.31)$$

$$n_g = k_L H(p^g - p^*) = k_L(C^* - C) \quad (2.32)$$

Define-se a velocidade de transferência de gás ($n_g a$) em função do coeficiente volumétrico de transferência de gás ($k_L a$), conforme a Equação (2.33).

$$n_g a = k_L a\, H(p^g - p^*) = k_L a\,(C^* - C) \quad (2.33)$$

Caso esteja ocorrendo variação da concentração da espécie gasosa (C) em relação ao tempo (t), a velocidade de transferência de gás ($n_g a$) pode ser escrita pela Equação (2.34).

$$\frac{dC}{dt} = k_L a\,(C^* - C) \quad (2.34)$$

2.5.2 Estimativa do coeficiente volumétrico individual de transferência de massa - $k_L a$

Reescrevendo-se a Equação (2.34) de forma linear, têm-se as Equações 2.35 e 2.36, as quais respectivamente ajustadas a dados experimentais de oxigênio dissolvido (OD) e dióxido de carbono, em função do tempo, fornecem estimativas do coeficiente de transferência de massa para o oxigênio ($k_L a_{O2}$), bem como para o CO_2 ($k_L a_{CO2}$).

$$ln\left(\frac{C_{O_2}^* - C_{O_2}}{C_{O_2}^* - C_{O_2}^0}\right) = -k_L a_{O_2}(t - t_0) \tag{2.35}$$

$$ln\left(\frac{C_{CO_2}^* - C_{CO_2}}{C_{CO_2}^* - C_{CO_2}^0}\right) = -k_L a_{CO_2}(t - t_0) \tag{2.36}$$

sendo $C_{CO_2}^0$ e $C_{O_2}^0$ são as concentrações de CO_2 e OD no tempo t_0, respectivamente, e C_{CO_2} e C_{O_2} as concentrações de CO_2 e OD no tempo t, respectivamente.

2.6 Modelagem da fluidodinâmica

Para descrever o comportamento de um fluido isotérmico escoando em determinado volume de controle, dois parâmetros devem ser considerados, sendo eles o transporte de massa e de momento, conforme descrito por Bird *et al.*, (2004).

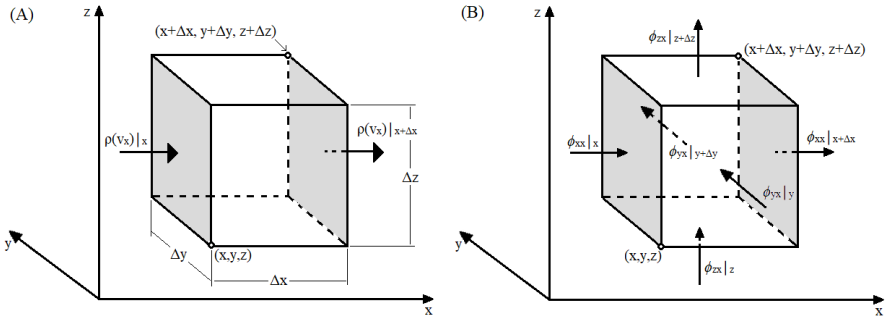

Figura 2.12 – Elemento de volume da Equação da continuidade
Fonte: BIRD et al., (2004)

A Equação da Continuidade, que considera a conservação de massa no sistema, é desenvolvida a partir de um balanço de massa sobre um elemento de volume ΔxΔyΔz (Figura 2.12-A), através do qual um fluido está escoando. Considerando-se que as taxas de entrada e de saída de massa no elemento de volume através das áreas sombreadas em x e x+Δx são $(\rho u_x)|_x \Delta y \Delta z$ e $(\rho u_x)|_{x+\Delta x} \Delta y \Delta z$, respectivamente, e aplicando-se este mesmo conceito para os outros dois pares de faces, o balanço de massa toma a forma apresentada na Equação 2.37. Dividindo-se a Equação 2.37 por ΔxΔyΔz e plicando-se a definição de derivada parcial, tem-se a Equação 2.38, que representa a Equação da Continuidade. A equação 2.39 representa a Equação da Continuidade na forma vetorial e considerando-se fluido incompressível.

$$\Delta x\Delta y\Delta z\frac{\partial \rho}{\partial t} = \Delta y\Delta z[(\rho u_x)|_x - (\rho u_x)|_{x+\Delta x}] + \Delta x\Delta z\left[(\rho u_y)\big|_y - (\rho u_y)\big|_{y+\Delta y}\right] + \Delta x\Delta y[(\rho u_z)|_z - (\rho u_z)|_{z+\Delta z}] \quad (2.37)$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\left(\frac{\partial}{\partial x}\rho u_x + \frac{\partial}{\partial y}\rho u_y + \frac{\partial}{\partial z}\rho u_z\right) \quad (2.38)$$

$$(\nabla \cdot \vec{u}) = 0 \quad (2.39)$$

Para se desenvolver a Equação do Movimento, é realizado um balanço de momento no volume de controle ΔxΔyΔz, apresentado na Figura 2.12-B. Para tanto, é considerado que momento entra e sai de ΔxΔyΔz por dois mecanismos, transporte convectivo e transporte molecular. As taxas com que a componente de momento de direção x entra e sai através das faces sombreadas x e x+Δx por todos os mecanismos são $(\phi_{xx})|_x \Delta y\Delta z$ e $(\phi_{xx})|_{x+\Delta x}\Delta y\Delta z$, respectivamente. Aplicando-se este mesmo conceito para as faces y e z tem-se a taxa líquida de adição de momento de direção x através dos 3 pares de faces, apresentada na Equação 2.40. Além disso, a força externa agindo sobre o fluido, tipicamente a força gravitacional, deve ser levada em consideração de acordo com o termo $\rho g_x \Delta x\Delta y\Delta z$. Igualando-se a Equação 2.40 à taxa de aumento de momento na direção x, $\partial(\rho u_x)/\partial t$, tem-se o balanço da componente de momento de direção x. Dividindo-se esta equação por ΔxΔyΔz e tomando-se o limite quando Δx, Δy e Δz tendem a zero, obtém-se a Equação 2.41. De forma similar, são obtidas as equações para as componentes y e z do balanço de momento.

Tomando-se as equações das componentes x, y e z (Equação 2.41) na forma vetorial – tensorial, multiplicando-se o i-ésimo componente pelo vetor unitário da direção *i* e somando-se os 3 componentes vetorialmente, tem-se a Equação 2.42, que é a forma diferencial da lei de conservação de momento. Considerando-se que o tensor fluxo combinado de momento, $\vec{\phi}$, é a soma do tensor fluxo convectivo de momento, $\rho\vec{u}\vec{u}$, e do tensor fluxo molecular de momento, $\vec{\pi}$, sendo que este pode ser escrito como a soma das tensões normais de pressão – $p\vec{\delta}$, sendo $\vec{\delta}$ um vetor unitário que indica que a pressão ocorre apenas na direção ortogonal, e das tensões de cisalhamento – $\vec{\tau}$, tem-se a Equação do Movimento, apresentada na Equação 2.43.

$$\Delta y\Delta z((\phi_{xx})|_x - (\phi_{xx})|_{x+\Delta x}) + \Delta z\Delta x\left((\phi_{yx})\big|_y - (\phi_{yx})\big|_{y+\Delta y}\right) + \Delta x\Delta y((\phi_{zx})|_z - (\phi_{zx})|_{z+\Delta z}) \quad (2.40)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}\rho u_x = -\left(\frac{\partial}{\partial x}\phi_{xx} + \frac{\partial}{\partial y}\phi_{yx} + \frac{\partial}{\partial z}\phi_{zx}\right) + \rho g_x \quad (2.41)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}\rho\vec{u} = -\left[\nabla\cdot\vec{\phi}\right] + \rho\vec{g} \tag{2.42}$$

$$\frac{\partial}{\partial t}\rho\vec{u} = -[\nabla\cdot\rho\vec{u}\vec{u}] - \nabla p - [\nabla\cdot\vec{\tau}] + \rho\vec{g} \tag{2.43}$$

2.6.1 Sistemas monofásicos

As equações *Reynolds-Averaged Navier-Stokes* (RANS) (BIRD *et al.,* 2004) podem ser utilizadas para descrever o movimento do fluido no sistema monofásico, considerando-se um fluido incompressível, Newtoniano e em regime permanente. As equações da conservação da continuidade e da quantidade de movimento são dadas pelas Equações 2.44 e 2.45, respectivamente.

$$\rho\nabla.(\vec{u}) = 0 \tag{2.44}$$

$$\rho\frac{\partial\vec{u}}{\partial t} + \rho(\vec{u}.\nabla)\vec{u} = \nabla.[-p_l + (\mu + \mu_{Turb})(\nabla\vec{u} + (\nabla\vec{u})^T)] + \vec{F} \tag{2.45}$$

sendo ρ a densidade (kg m^{-3}); u o vetor velocidade (m s^{-1}); p a pressão (Pa); μ a viscosidade dinâmica (Pa s); μ_{Turb} a viscosidade dinâmica turbulenta (Pa s); e $\vec{F}$ uma força de volume adicional, geralmente associada à força gravitacional (N m^{-3}).

2.6.1.2 Modelos de turbulência – sistema monofásico

O escoamento de fluidos de forma não linear, ou caótica, representa um sistema turbulento. A propensão de um fluxo isotérmico se tornar turbulento é medido pelo número de Reynolds - Re (Equação 2.46).

$$Re = \frac{\rho UL}{\mu} \tag{2.46}$$

sendo ρ a densidade do fluido (kg m^{-3}); U (m s^{-1}) e L (m) os escalares de velocidade e comprimento do fluido; μ a viscosidade dinâmica (kg m^{-1} s^{-1}).

Em se tratando da modelagem da turbulência de um fluxo, diversas abordagens foram propostas, com modelos compostos por uma equação, como a de Prandtl (PRANDTL, 1945), ou duas equações, como o k-ε.

Um modelo de turbulência amplamente utilizado é o k-ε (WILCOX, 2006), que considera a viscosidade turbulenta como mostrado na Equação 2.47. Neste modelo, duas equações de transporte extra são utilizadas para duas variáveis adicionais: a energia cinética turbulenta – k (Equação 2.48), e a taxa de dissipação da energia turbulenta – ε (Equação 2.49). O termo de produção de energia cinética (P_k) é apresentado na Equação 2.50.

$$\mu_{Turb} = \rho C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon} \tag{2.47}$$

$$\rho \frac{\partial k}{\partial t} + \rho(\vec{u}.\nabla)k = \nabla.\left[\left(\mu + \frac{\mu_{Turb}}{\sigma_k}\right)\nabla k\right] + P_k - \rho\varepsilon \tag{2.48}$$

$$\rho \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} + \rho(\vec{u}.\nabla)\varepsilon = \nabla.\left[\left(\mu + \frac{\mu_{Turb}}{\sigma_\varepsilon}\right)\nabla \varepsilon\right] + \frac{\varepsilon}{k} C\varepsilon_1 P_k - \rho C\varepsilon_2 \frac{\varepsilon^2}{k} \tag{2.49}$$

$$P_k = \mu_{Turb}\left(\nabla\vec{u}:(\nabla\vec{u} + (\nabla\vec{u})^T) - \frac{2}{3}(\nabla.\vec{u})^2\right) - \frac{2}{3}\rho k \nabla.\vec{u} \tag{2.50}$$

sendo C_μ, $C_{\varepsilon 1}$, $C_{\varepsilon 2}$, σ_k e $x\sigma_\varepsilon$ constantes do modelo fixas em 0,09, 1,44, 1,92, 1,0 e 1,3, respectivamente (WILCOX, 2006).

Outro modelo de turbulência altamente difundido é o modelo de k-ω, que considera a energia cinética turbulenta (k) e a dissipação por unidade de energia cinética turbulenta (ω), conforme apresentado nas Equações 2.51 e 2.52, respectivamente.

$$\rho \frac{\partial k}{\partial t} + \rho\vec{u} \cdot \nabla k = P_k - \rho\beta^* k\omega + \nabla \cdot \left((\mu + \sigma^* \mu_{Turb})\nabla k\right) \tag{2.51}$$

$$\rho \frac{\partial \omega}{\partial t} + \rho\vec{u} \cdot \nabla \omega = \alpha \frac{\omega}{k} P_k - \rho\beta\omega^2 + \nabla \cdot \left((\mu + \sigma\mu_{Turb})\nabla\omega\right) \tag{2.52}$$

sendo:

$$\mu_T = \rho \frac{k}{\omega} \tag{2.53}$$

$$\alpha = \frac{13}{25} \quad \beta = \beta_0 f_\beta \quad \beta^* = \beta_0^* f_\beta \quad \sigma = \frac{1}{2} \quad \sigma^* = \frac{1}{2}$$
$$\beta_0 = \frac{13}{125} \quad f_\beta = \frac{1 + 70\chi_\omega}{1 + 80\chi_\omega} \quad \chi_\omega = \frac{\Omega_{ij}\Omega_{ik}S_{ki}}{(\beta_0^*\omega)^3} \tag{2.54}$$

$$\beta_0^* = \frac{9}{100} \quad f_\beta \cdot= \begin{bmatrix} 1 & \chi_k \leq 0 \\ \frac{1 + 680\chi_k^2}{1 + 400\chi_k^2} & \chi_k > 0 \end{bmatrix} \quad \chi_k = \frac{1}{\omega^3}(\nabla k \cdot \nabla\omega) \tag{2.55}$$

Além destes, existem outros modelos de duas equações que descrevem a turbulência de um sistema de fluxo, como o modelo SST (MENTER, 1994), k-ε para baixos Re (ABE *et al*., 1994), Spalart-Allmaras (WILCOX, 2006), entre outros.

2.6.2 Sistemas multifásicos

As abordagens mais comuns para a modelagem de fluxo de bolhas, que caracteriza um escoamento multifásico, são a de Euler-Euler e a de Euler-Lagrange (ABD ALI, 2014). Na primeira, também conhecida como teoria dos dois fluidos, ambas as fases (contínua – líquido e dispersa – gás) são modeladas como dois contínuos interpenetrantes. Já na segunda abordagem, as equações de *volume-averaged* Navier-Stokes para um elemento de volume médio são usadas para descrever o movimento do líquido e cada bolha é rastreada com base em um balanço de massa das forças atuantes (MOUSAVI *et al.*, 2008).

Nos casos em que a fração da fase dispersa é alta, o número de bolhas que devem ser rastreadas é maior, tornando o modelo Euler-Euler mais adequado (GARCÍA *et al*., 2012) – mais simples e menor demanda computacional – perde exatidão nos resultados finais já que não considera coalescência e divisão de bolhas. Assim, o modelo é adequado e válido para a modelagem de fluxos multifásicos induzidos por bolhas (BITOG *et al.*, 2011; KRISHNA *et al*., 2000; STUDLEY & BATTAGLIA, 2011).

O modelo macroscópico de Euler-Euler para fluxo de fluidos pode ser utilizado nas simulações do fluxo de bolhas dentro do PBR, considerando-se duas fases, sob as seguintes hipóteses (LUO & AL-DAHHAN, 2011):

- Ambas as fases são continuações interpenetrantes;
- Ambos os fluidos são incompressíveis, cuja pressão é $p = p_l = p_g$;
- A fase gasosa dispersa caracteriza-se por bolhas esféricas de tamanhos uniformes;
- A turbulência da fase gasosa é insignificante, sendo relacionada à da fase líquida;
- A turbulência da fase líquida é representada pelo modelo k:ε modificado;
- Todo o domínio fluido é isotérmico;
- A coalescência ou a quebra de bolhas são desprezíveis;
- As bolhas são contínuas com propriedades semelhantes às da fase líquida;
- A transferência de massa entre fases é desprezível.

De forma similar ao modelo monofásico, no modelo de Euler-Euler para duas fases, o movimento de cada fase é determinado por equações de conservação de massa e momento. Neste caso, no entanto, depois de adaptadas a todas as considerações acima, tomam as

formas apresentadas nas Equações 2.56 e 2.57, respectivamente. A Equação 2.58 representa a fase de transporte gasosa (COMSOL, 2013).

$$\frac{\partial(\gamma_l\rho_l + \gamma_g\rho_g)}{\partial \mathrm{t}} + \nabla.(\gamma_l\rho_l\vec{u}_l + \gamma_g\rho_g\vec{u}_g) = 0 \tag{2.56}$$

$$\begin{aligned}\gamma_l\rho_l\frac{\partial\overrightarrow{u_l}}{\partial t} + \gamma_l\rho_l(\vec{u}_l.\nabla)\vec{u}_l \\ = \nabla.\left[-p_I + \gamma_l(\mu_l + \mu_{Turb})\left(\nabla\vec{u}_l + (\nabla\vec{u}_l)^T - \frac{2}{3}(\nabla.\vec{u}_l)I\right)\right] \\ + \gamma_l\rho_l g + F\end{aligned} \tag{2.57}$$

$$\frac{\partial\gamma_g\rho_g}{\partial \mathrm{t}} + \nabla.\left(\gamma_g\rho_g(\vec{u}_l + \vec{u}_{slip})\right) = \nabla.\left(\frac{\tilde{\mu}\rho_g}{\rho_l}\nabla\gamma_g\right) \tag{2.58}$$

sendo γ a fração volumétrica de cada fase (m^3 m^{-3}); $\tilde{\mu}$ a viscosidade efetiva que causa movimento.

2.6.2.1 Modelos de escoamento

A forma mais simples de representar o escoamento de bolhas em um seio líquido é assumindo que o meio seja homogêneo, ou seja, as bolhas sempre seguem o fluxo do líquido, caso em que $\vec{u}_{slip} = 0$.

Outra abordagem é o equilíbrio de pressão de arraste (Equações 2.59 e 2.60), que pressupõe que as forças de pressão sobre uma bolha são equilibradas pela força de arraste (SOKOLICHIN *et al*., 2004). O modelo é aplicado para bolhas maiores do que 2 mm.

$$\frac{3}{4}\frac{C_d}{d_b}\rho_l|\vec{u}_{slip}|\vec{u}_{slip} = -\nabla p \tag{2.59}$$

$$C_d = \frac{0.622}{\frac{1}{E\ddot{o}} + 0.235}, \qquad \text{sendo } E\ddot{o} = \frac{g\rho_l d_b^2}{\sigma} \tag{2.60}$$

sendo C_d o coeficiente de arraste viscoso (adimensional); e d_b o diâmetro das bolhas (m).

Já para bolhas de ar de 1 a 10 mm de diâmetro médio dispersas em água, Schwarz e Turner (SCHWARZ & TURNER, 1988) propuseram a versão linearizada da Equação 2.59, conforme apresentado na Equação 2.61.

$$C_w\vec{u}_{slip} = -\nabla p, \qquad sendo\ C_w = 5.10^4 kg/m^3 s \tag{2.61}$$

Para bolhas esféricas com diâmetro menor que 2 mm, o modelo de Hadamard-Rybczynski (CROWE *et al*., 1998) considera o coeficiente de arraste conforme apresentado na Equação 2.62.

$$C_d = \frac{16}{Re_b}, \qquad \text{sendo } Re_b = \frac{d_b \rho_l |\vec{u}_{slip}|}{\mu_l} \tag{2.62}$$

2.6.2.2 Modelos de turbulência – sistema multifásico

Em sistemas multifásicos, a modelagem da turbulência é realizada de forma similar aos sistemas monofásicos, podendo ser aplicados os mesmos modelos apresentados no tópico 2.6.1.2. Neste âmbito, o modelo k-ε toma a forma apresentada nas equações 2.63 a 2.66.

$$\mu_{Turb} = \rho_l C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon} \tag{2.63}$$

$$\rho_l \frac{\partial k}{\partial t} + \rho_l \vec{u}_l . \nabla k = \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_{Turb}}{\sigma_k} \right) \nabla k \right] + P_k - \rho_l \varepsilon + S_k \tag{2.64}$$

$$\rho_l \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} + \rho_l \vec{u}_l . \nabla \varepsilon = \nabla . \left[\left(\mu + \frac{\mu_{Turb}}{\sigma_\varepsilon} \right) \nabla \varepsilon \right] + C\varepsilon_l \frac{\varepsilon}{k} C\varepsilon_1 P_k - \rho_l C\varepsilon_2 \frac{\varepsilon^2}{k} + C\varepsilon S_k \frac{\varepsilon}{k} \tag{2.65}$$

$$S_k = -C_k \emptyset_g \nabla p \, \vec{u}_{slip} \tag{2.66}$$

2.7 Cinética de crescimento celular

Os modelos matemáticos de processos biológicos podem ser divididos, inicialmente, em dois grupos, os modelos fenomenológicos e os modelos entrada-saída (SCHMIDELL *et al.*, 2001). As redes neurais representam um exemplo importante dos modelos entrada-saída, onde se utiliza um número definido de variáveis de entrada mensuráveis para gerar correlações que permitem calcular as respostas do sistema. De outro lado, existem diversos modelos fenomenológicos, os quais baseados em análises teóricas e equacionamento por balanços de matéria e energia são capazes de descrever inúmeros bioprocessos.

2.7.1 Modelos Fenomenológicos

Nestes modelos, os fenômenos e o comportamento das variáveis do processo são explicados com base na formulação de hipóteses e correlações teóricas ou empíricas. Na sua formulação, são normalmente utilizadas equações que podem ser classificadas em balanços de massa, equações de velocidade e relações termodinâmicas, constituindo-se por um conjunto de correlações matemáticas entre as variáveis de interesse do sistema em estudo.

Admitindo-se o número de componentes na representação celular, os modelos cinéticos de processos biotecnológicos são classificados em: estruturados e não-estruturados. Os modelos estruturados são complexos, levando em consideração as variações dos componentes celulares e fornecendo uma descrição mais precisa do estado das células a partir da avaliação das diferentes maneiras que as células utilizam as fontes de energia. Diferentes modelos estruturados são apresentados na literatura: KOMPALA *et al.,* (1986); RAMKRISHNA *et al.,* (1996); JONES & KOMPALA, (1999); HAMILTON *et al.,* (2005) e NARANG, (2006). Uma revisão acerca de modelagem estruturada é apresentada em PATNAIK (2000).

Por outro lado, os modelos não-estruturados são geralmente simples, considerando as variações dos componentes celulares como desprezíveis. Nesses modelos as descrições matemáticas são baseadas em observações da cinética de crescimento e o material celular é representado por apenas uma variável. Os clássicos modelos de Monod (1942) e Andrews (1968) representam essa consideração. Os modelos não-estruturados são necessários para o entendimento da cinética no nível populacional, mesmo sendo considerados inadequados para descrever os mecanismos complexos de regulação interna. O modelo de Monod (1942) representa a limitação pelo substrato, a partir do qual diversos modelos foram propostos, tais como Tessier, Moser e Contois (BAILEY & OLLIS, 1986; SCHMIDEL *et al*., 2001). Da mesma forma, a partir do modelo de inibição de Andrews e colaboradores (1968), foram propostos outros modelos, como o de Aiba (1968), Yano e Koga (1969) e Edwards (1970). Tais expressões são apresentadas em Lima *et al*., (2001).

Os modelos são também classificados em segregados (parâmetros distribuídos) e não-segregados (parâmetros concentrados) em função da heterogeneidade da população. Nos modelos segregados, admite-se uma população heterogênea, cuja unidade discreta representada pelo número de células é a variável fundamental, uma vez que a biomassa é assumida como unidade celular segregada em unidades estruturais e funcionais. Nos

modelos não-segregados, assume-se uma distribuição homogênea da biomassa em que a concentração celular é a variável fundamental, já que as células podem ser representadas pela propriedade média da população.

2.7.2 Taxa de crescimento específico

As equações cinéticas são utilizadas para descrever a influência de variáveis do sistema na taxa de crescimento específico (μ_{x_i}). Alguns parâmetros do processo, bem como compostos presentes no meio, influenciam na taxa de crescimento específico.

A expressão para a taxa de crescimento específico é função do modelo cinético, além do microrganismo. Quando existe a influência de mais de uma variável sobre o crescimento celular, essa relação pode ser apresentada por meio da forma aditiva (Equação 2.67) e da forma multiplicativa (Equação 2.68).

$$\mu_{Xr} = \sum_{i=1}^{n} \mu_{x_i} \tag{2.67}$$

$$\mu_{Xr} = \prod_{i=1}^{n} \mu_{x_i} \tag{2.68}$$

2.8 Algoritmo Genético

Os algoritmos baseados no procedimento computacional estocástico Algoritmo Genético (AG) avaliam os parâmetros em intervalos pré-estabelecidos, diferentemente das técnicas tradicionais de busca e otimização de respostas, que buscam a otimização em torno de um ponto inicial.

Esta técnica possui uma ampla gama de aplicações, sendo utilizada em diversas áreas como, por exemplo, roteamento de veículos (ALVARENGA, 2005; HEINEN & OSÓRIO, 2006), composições musicais (ROCHA, 2011), problemas de otimização industrial (CONSTANTINO & JUNIOR, 2002) e síntese de redes de reuso de água (LAVRIC et al., 2005; TUDOR & LAVRIC, 2010; TUDOR & LAVRIC, 2011).

O algoritmo de busca baseia-se na avaliação da resposta de indivíduos – conjuntos de possíveis soluções – que compõem uma população. Esta população passa por

procedimentos de melhoria, chamados de seleção, cruzamento e mutação, a fim de convergir para uma resposta ótima.

Os principais parâmetros a serem controlados em um algoritmo genético são o tamanho da população, a taxa de seleção, a taxa de cruzamento e a taxa de mutação. O tamanho da população representa a quantidade de indivíduos iniciais avaliados, gerados a partir de valores dentro dos intervalos de busca pré-estabelecidos. A taxa de seleção determina a porcentagem da população que será substituída na próxima geração. A taxa de cruzamento determina a velocidade com que novas estruturas são inseridas na população. Valores muito baixos podem tornar o algoritmo lento, enquanto que valores muito altos podem ocasionar a perda de indivíduos de alta aptidão. Para evitar que a resposta esteja em um extremo local, a taxa de mutação determina a velocidade com que alguma mudança randômica é realizada nos indivíduos. Valores muito altos caracterizam uma busca essencialmente aleatória.

A inicialização do procedimento de busca consiste na geração de uma população inicial a partir dos intervalos pré-definidos, que pode ser realizada de forma aleatória ou determinística. Após esta etapa, segue-se para a avaliação da aptidão de cada indivíduo, com base na função objetivo. Depois é realizada a seleção dos indivíduos que seguirão para a próxima geração, sendo que maiores aptidões representam maiores chances de geração de descendentes. A seleção pode ser realizada pelo método da roleta (Figura 2.13 A), cujo espaço ocupado por cada indivíduo é proporcional ao seu valor de aptidão; pelo método do torneio (Figura 2.13 B), que escolhe *n* indivíduos de forma aleatória, e aquele com melhor aptidão é selecionado; e pelo método da dizimação (Figura 2.13 C), que exclui alguns indivíduos com menor aptidão, e seleciona aleatoriamente a nova população a partir dos indivíduos restantes.

Depois de selecionados, os indivíduos seguem para o cruzamento, etapa na qual pares de indivíduos são cruzados entre si pela troca de segmentos, gerando novos pares de indivíduos, chamados de filhos. Uma forma de cruzamento é o método do ponto único, no qual um ponto é escolhido de forma aleatória, e a partir deste ponto o material genético dos pais é trocado entre si, gerando-se os filhos, conforme apresentado na Figura 2.13 D. De forma similar, no método do ponto duplo (Figura 2.13 E), são escolhidos dois pontos aleatórios, e o material genético contido entre os dois pontos é trocado. Outra forma de cruzamento é o método dos pontos aleatórios (Figura 2.13 F), que determina

randomicamente uma máscara binária, cujo valor determina qual pai fornecerá o material genético para cada filho.

A mutação dos indivíduos pode ocorrer pelo método aleatório, conforme apresentado na Figura 2.13 G, no qual um ponto escolhido aleatoriamente tem seu valor trocado, ou pelo método da troca Figura 2.13 H, no qual *n* pares de genes são escolhidos aleatoriamente e seus valores são trocados entre si.

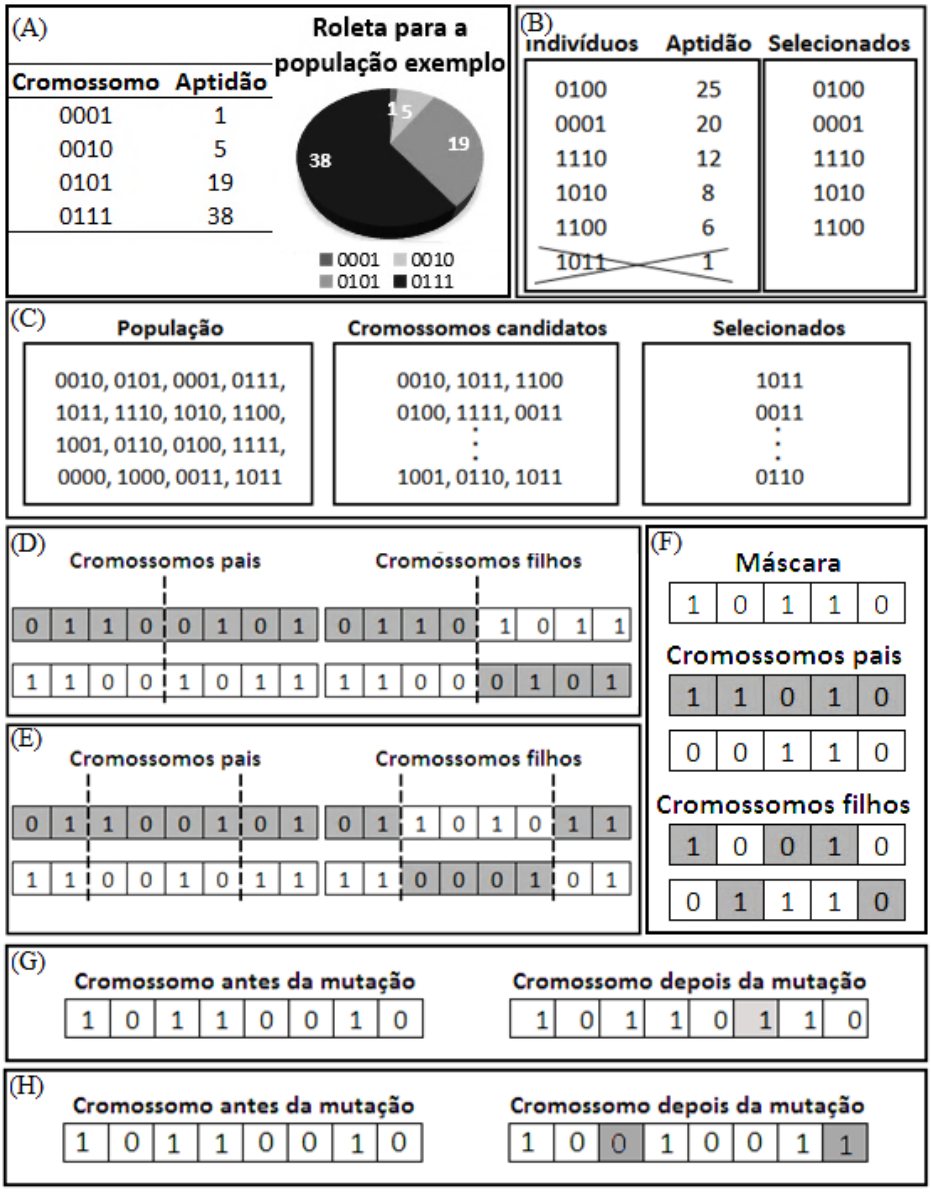

Figura 2.13 – Métodos de seleção, cruzamento e mutação dos Algoritmos Genéticos, sendo: (A) seleção por roleta; (B) seleção por torneio; (C) seleção por dizimação; (D) cruzamento por ponto único; (E) cruzamento por ponto duplo; (F) cruzamento por pontos aleatórios; (G) mutação aleatória; e (H) mutação por troca
Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, 2009

Após os procedimentos de cruzamento e mutação, a nova população é gerada, constituindo-se dos pais selecionados e dos filhos gerados. A partir daí a população é novamente avaliada junto ao conjunto de equações, e valores de aptidão são estabelecidos. O critério de parada do algoritmo pode ser tanto o número de iterações, quanto um valor de aptidão desejado.

2.9 Análises Estatísticas

A análise de variância (ANOVA) pode ser utilizada na comparação de médias observadas, quando houver mais de dois níveis de um único fator, e quando houver múltiplos níveis de mais de um fator. A ANOVA é um teste paramétrico que pressupõe que as observações sejam independentes, normalmente distribuídas, e que as variâncias sejam homogêneas (MONTGOMERY *et al.*, 2000). Assim, antes da aplicação da ANOVA, os dados devem ser analisados quanto à normalidade e à homogeneidade para garantir que o teste fornecerá resultados verdadeiros.

Conforme apontado por Montgomery e colaboradores (2000), o modelo de efeitos fixos pode ser ajustado aos dados experimentais para avaliar a existência de diferença entre as médias obtidas em cada tratamento. Para tanto, assume-se que erros experimentais são variáveis aleatórias independentes e que possuem distribuição normal com média zero e variância constante para todos os tratamentos. A estatística F calculada é comparada com um valor tabelado $F_{\alpha,a-1,a(n-1)}$. A hipótese nula do teste (Equação 2.69) é rejeitada quando $F_{calc} > F_{tab}$, indicando que existe ao menos um par de médias diferente no nível de significância considerado.

$$H_0: \mu_1^2 = \mu_2^2 = \cdots = \mu_k^2$$
$$H_1: \mu_i^2 \neq \mu_j^2, \forall\, i \neq j \tag{2.69}$$

Para a verificação do pressuposto de homogeneidade da variância, os parâmetros estatísticos mais utilizados são: Cochran, Hartley e Bartlett. A hipótese de normalidade dos dados pode ser verificada pelos testes: Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilk.

A ANOVA aponta se existem uma ou mais médias de níveis dos fatores que são estatisticamente diferentes, porém não identifica quantas ou quais são estas médias. Para tal investigação são utilizados os Métodos de Comparações Múltiplas, entre os quais existem

Mínima Diferença Significativa (MDS) de Fisher; Diferença Honestamente Significativa (DHS) de Tukey, e o teste múltiplo de Duncan.

2.9.1 ANOVA unifatorial

Considerando-se o modelo linear estatístico dado pela Equação 2.70, apresentado por Montgomery e colaboradores (2000), tem-se uma variável aleatória (Y_{ij}) denotando a ij-ésima observação.

$$Y_{ij} = \mu_i + \epsilon_{ij} \begin{cases} i = 1,2,\dots,a \\ j = 1,2,\dots,n \end{cases} \tag{2.70}$$

sendo μ_i a média do i-ésimo nível, constituindo-se pela soma da média global, comum a todos os níveis e do efeito do i-ésimo nível, μ e τ_i, respectivamente, ϵ_{ij} a componente do erro aleatório, a o número de níveis do fator e n o número de observações em cada nível.

Neste modelo assume-se que os erros ϵ_{ij} sejam normal e independentemente distribuídos, com média zero e variância σ^2. Consequentemente, cada nível pode ser tratado como uma população normal com média μ_i e variância σ^2.

Desenvolvendo-se a análise de variância para o modelo com efeitos fixos, as conclusões obtidas não podem ser estendidas a níveis similares que não tenham sido estudados. Neste caso, os efeitos dos níveis, τ_i, são definidos como desvios da media global μ, de modo apresentado na Equação 2.71.

$$\sum_{i=1}^{a} \tau_i = 0 \tag{2.71}$$

sendo y_i. o total de observações sujeitas ao i-ésimo nível, $\bar{y}_i$. a média das observações sujeitas ao i-ésimo nível, y.. o efeito global de todas as observações e $\bar{y}$.. a média global de todas as observações, tem-se as Equações 2.72 a 2.75.

$$y_i. = \sum_{j=1}^{n} y_{ij} \tag{2.72}$$

$$\bar{y}_i. = \frac{y_i}{n} \quad i = 1,2,\dots,a \tag{2.73}$$

$$y.. = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n} y_{ij} \tag{2.74}$$

$$\bar{y}.. = \frac{y..}{N} \tag{2.75}$$

sendo $N = na$ o número total de observações.

Para testar a hipótese de igualdade das médias dos a níveis, μ_1, μ_2, ..., μ_a, utiliza-se a Equação 2.71, que resulta na Equação 2.76.

$$\begin{gathered} H_0: \tau_1 = \tau_2 = \cdots = \tau_a = 0 \\ H_1: \tau_i \neq 0 \ \ para\ no\ mínimo\ um\ i \end{gathered} \tag{2.76}$$

Assim, se a hipótese nula for verdadeira, a mudança de níveis do fator não tem efeito na resposta da média.

A variabilidade total nos dados é descrita pela soma total dos quadrados apresentada na Equação 2.77, sendo essa dividida em dois componentes (Equação 2.78), sendo a forma simplificada apresentada na Equação 2.79. O teste de hipóteses é baseado na comparação das duas estimativas independentes da variância da população.

$$SQ_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}\left(y_{ij} - \bar{y}..\right)^2 \tag{2.77}$$

$$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}\left(y_{ij} - \bar{y}..\right)^2 = n\sum_{i=1}^{a}(y_i. - \bar{y}..)^2 + \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}\left(y_{ij} - \bar{y}.\right)^2 \tag{2.78}$$

$$SQ_T = SQ_{Níveis} + SQ_E \tag{2.79}$$

sendo $SQ_{níveis}$ a soma dos quadrados das diferenças entre as médias dos níveis e a média global – mede as diferenças entre os níveis (a – 1 graus de liberdade), e SQ_E a soma dos quadrados das diferenças entre as observações dentro de um nível e a média dos níveis – devido apenas ao erro aleatório (a (n – 1) graus de liberdade).

A partir da Equação 2.79 tem-se o valor esperado da soma dos quadrados dos níveis, apresentado na Equação 2.80, e o valor esperado da soma dos quadrados dos erros, apresentado na Equação 2.81.

$$E(SQ_{\text{níveis}}) = (a-1)\sigma^2 + n\sum_{i=1}^{a}\tau_i^2 \tag{2.80}$$

$$E(SQ_E) = a(n-1)\sigma^2 \tag{2.81}$$

Se a hipótese nula (Equação 2.76) for verdadeira, a Média Quadrática dos Níveis ($MQ_{níveis}$), apresentada na Equação 2.82, será um estimador não-tendencioso de σ^2. No entanto, se H_1 for verdadeira, a Equação 2.82 estimará σ^2 mais um termo positivo que incorpora a variação devida à diferença sistemática nas médias dos níveis. Já a média

quadrática do erro, apresentada na Equação 2.83, é um estimador não-tendencioso de σ^2, independentemente se H_0 é ou não verdadeira.

$$MQ_{\text{níveis}} = \frac{SQ_{\text{níveis}}}{(a-1)} \tag{2.82}$$

$$MQ_E = \frac{SQ_E}{a(n-1)} \tag{2.83}$$

Pode-se verificar que $MQ_{\text{níveis}}$ e MQ_E são independentes e que, se a hipótese nula for verdadeira a razão apresentada na Equação 2.84 terá uma distribuição F com a – 1 e a (n – 1) graus de liberdade.

$$F_0 = \frac{SQ_{\text{níveis}}/(a-1)}{SQ_E/[a(a-1)]} = \frac{MQ_{\text{níveis}}}{MQ_E} \tag{2.84}$$

Considerando-se que, se a hipótese alternativa H_1 for verdadeira, o valor esperado de $MQ_{\text{níveis}}$ será maior que σ^2, o valor esperado do numerador da estatística de teste (2.84) é maior do que o valor esperado do denominador. Consequentemente, rejeita-se H_0 se a estatística for grande, implicando em uma região crítica unilateral superior. Desta forma, H_0 é rejeitado se $F_0 > F_{\alpha,a-1,a(n-1)}$, sendo f_0 calculado pela Equação 2.84.

2.9.2 ANOVA multifatorial

No caso de dois fatores, conforme apresentado por Montgomery *et al*. (2000), o modelo estatístico linear toma a forma apresentada na Equação 2.85, onde a ijk-ésima observação (Y_{ijk}) depende dos efeitos principais de cada fator, bem como dos efeitos das interações entre os fatores.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau\beta_{ij} + \epsilon_{ijk} \begin{cases} i = 1,2,\dots,a \\ j = 1,2,\dots,b \\ k = 1,2,\dots,n \end{cases} \tag{2.85}$$

sendo μ a média global, τ_i o efeito do i-ésimo nível do fator A, β_j o efeito do j-ésimo nível do fator B, $\tau\beta_{ij}$ o efeito de interação entre A e B e ϵ_{ijk} o componente do erro aleatório, tendo uma distribuição normal, com média zero e variância σ^2.

Considerando-se fatores fixos, o que restringe as inferências aos níveis estudados, assume-se que τ_i, β_j e $\tau\beta_{ij}$ são desvios da média, de modo que $\sum_{i=1}^{a} \tau_i = 0$, $\sum_{i=1}^{b} \beta_j = 0$, $\sum_{i=1}^{a} \tau\beta_{ij} = 0$ e $\sum_{i=1}^{b} \tau\beta_{ij} = 0$. As hipóteses testadas pela ANOVA

assumem que não existem efeitos principais dos fatores A e B, bem como da interação entre estes fatores, conforme apresentado nas Equações 2.86 a 2.88.

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \cdots = \tau_a = 0 \ (nenhum\ efeito\ principal\ do\ fator\ A)$$
$$H_1: \tau_i \neq 0 \ \ para\ no\ mínimo\ um\ i \tag{2.86}$$

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \cdots = \beta_b = 0 \ (nenhum\ efeito\ principal\ do\ fator\ B)$$
$$H_1: \beta_j \neq 0 \ \ para\ no\ mínimo\ um\ j \tag{2.87}$$

$$H_0: (\tau\beta)_{11} = (\tau\beta)_{12} = \cdots = (\tau\beta)_{ab} = 0 \ (nenhuma\ interação)$$
$$H_1: (\tau\beta)_{ij} \neq 0 \ \ para\ no\ mínimo\ um\ ij \tag{2.88}$$

Se a hipótese nula for verdadeira, a mudança dos níveis do fator não tem efeito na resposta média.

Considerando-se que $y_{i..}$ seja o total de observações sujeitas ao i-ésimo nível do fator A, $y_{.j.}$ o total de observações sujeitas ao i-ésimo nível do fator B, $y_{ij.}$ o total de observações para cada réplica ij, y... o total global de todas as observações e $\bar{y}_{i..}$ $\bar{y}_{.j.}$ $\bar{y}_{ij}$ e $\bar{y}_{...}$ as médias correspondentes, tem-se as definições apresentadas nas Equações 2.89 a 2.92.

$$y_{i..} = \sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk} \qquad \bar{y}_{i..} = \frac{y_{i..}}{bn} \qquad i = 1,2,\ldots,a \tag{2.89}$$

$$y_{.j.} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk} \qquad \bar{y}_{.j.} = \frac{y_{.j.}}{an} \qquad j = 1,2,..,b \tag{2.90}$$

$$y_{ij..} = \sum_{k=1}^{n} y_{ijk} \qquad \bar{y}_{ij} = \frac{y_{ij..}}{n} \qquad i = 1,2,\ldots,a \tag{2.91}$$

$$y... = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} y_{ijk} \qquad \bar{y}... = \frac{y...}{abn} \qquad j = 1,2,\ldots,b \tag{2.92}$$

A ANOVA divide a variabilidade total nos dados em partes componentes, comparando os vários elementos dessa decomposição. A variabilidade total nos dados é descrita pela soma total dos quadrados das observações, apresentada na Equação 2.93.

$$SQ_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n}\left(y_{ijk} - \bar{y}...\right)^2 \tag{2.93}$$

A decomposição da soma dos quadrados é apresentada em detalhes na Equação 2.94, e simplificadamente na Equação 2.95.

$$SQ_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{n}\left(y_{ij} - \bar{y}..\right)^2 \tag{2.94}$$

$$= bn\sum_{i=1}^{a}(\bar{y}_i.. - \bar{y}...)^2 + an\sum_{i=1}^{b}\left(\bar{y}_{.j}. - \bar{y}...\right)^2$$

$$+ n\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\left(\bar{y}_{ij}. - \bar{y}_i.. - \bar{y}_{.j}. - \bar{y}...\right)^2 + \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n}\left(y_{ijk} - \bar{y}_{ij}.\right)^2$$

$$SQ_T = SQ_A + SQ_B + SQ_{AB} + SQ_E \tag{2.95}$$

sendo SQ_A a soma dos quadrados para o fator A (a-1 graus de liberdade), SQ_B a soma dos quadrados para o fator B (b-1 graus de liberdade), SQ_{AB} a soma dos quadrados para a interação entre os fatores A e B ((a-1)(b-1) graus de liberdade) e SQ_E a soma dos quadrados para o erro (ab(n-1) graus de liberdade).

As médias quadráticas, obtidas pela divisão dos termos do lado direito da equação 2.95, para A, B, a interação e o erro são apresentados na Equação 2.96.

$$MQ_A = \frac{SQ_A}{(a-1)} \quad MQ_B = \frac{SQ_B}{(b-1)} \quad MQ_{AB} = \frac{SQ_{AB}}{(a-1)(b-1)} \quad MQ_E = \frac{SQ_E}{ab(n-1)} \tag{2.96}$$

Considerando-se que A e B sejam fixos, os valores esperados das médias quadráticas são representados pelas Equações 2.97 a 2.100.

$$E(MQ_A) = E\left(\frac{SQ_A}{a-1}\right) = \sigma^2 + \frac{bn\sum_{i=1}^{a}\tau_i^2}{a-1} \tag{2.97}$$

$$E(MQ_B) = E\left(\frac{SQ_B}{b-1}\right) = \sigma^2 + \frac{an\sum_{j=1}^{b}\beta_i^2}{b-1} \tag{2.98}$$

$$E(MQ_{AB}) = E\left(\frac{SQ_{AB}}{(a-1)(b-1)}\right) = \sigma^2 + \frac{n\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}(\tau\beta)_i^2}{(a-1)(b-1)} \tag{2.99}$$

$$E(MQ_E) = E\left(\frac{SQ_E}{ab(n-1)}\right) = \sigma^2 \tag{2.100}$$

Se as hipóteses nulas a respeito dos efeitos principais e a hipótese a respeito das interações forem verdadeiras, todas as quatro medias quadráticas serão estimativas não-tendenciosas de σ^2. Para testar tais hipóteses apresentadas nas Equações 2.86 a 2.88, são utilizadas as razões $F_0 = \frac{MQ_A}{MQ_E}$, $F_0 = \frac{MQ_B}{MQ_E}$ e $F_0 = \frac{MQ_{AB}}{MQ_E}$, respectivamente. Nestes casos, se H_0 for verdadeira, a razão F_0 terá uma distribuição F com os respectivos graus de liberdade. Assim, rejeita-se H_0 em um nível de significância α se $F_0 > F_{tabelado}$.

2.9.3 Testes de homogeneidade da variância

Para a avaliação da veracidade do pressuposto de homogeneidade da variância (Equação 2.101) aplicam-se as estatísticas de Bartlett, Cochran e Hartley.

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \cdots = \sigma_k^2$$
$$H_1: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2, \forall\, i \neq j \tag{2.101}$$

2.9.3.1 Estatística χ^2 de Bartlett

A estatística χ^2 de Bartlett assume que, caso a hipótese nula seja verdadeira, a Equação 2.102 apresenta uma distribuição assintótica qui-quadrado com k-1 graus de liberdade. Assim, rejeita-se H_0 se $P\left[\chi^2 \geq \chi^2_{(\alpha;d.f.)}\right]$ foi menor que o nível de significância (α) estabelecido. Este teste é sensível à hipótese de normalidade das observações.

$$\chi^2 = \frac{(\mathrm{N}_T - \mathrm{k})\ln(\mathrm{s}_p^2) - \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{k}}(\mathrm{gl})_\mathrm{i}\ln(\mathrm{s}_\mathrm{i}^2)}{1 + \left(\frac{1}{3(\mathrm{k}-1)}\right)\left[\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{k}}\frac{1}{(\mathrm{gl})_\mathrm{i}} - \frac{1}{(\mathrm{N}_T - \mathrm{k})}\right]} \tag{2.102}$$

$$\mathrm{s}_\mathrm{i}^2 = \frac{\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{NE}}\left(\mathrm{y}_\mathrm{i}^{\exp} - \bar{\mathrm{y}}_\mathrm{i}\right)^2}{\mathrm{NE} - 1} \tag{2.103}$$

$$\mathrm{s}_p^2 = \frac{\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{k}}(\mathrm{gl})_\mathrm{i}\mathrm{s}_\mathrm{i}^2}{(\mathrm{N}_T - \mathrm{k})} \tag{2.104}$$

sendo s_p^2 a variância combinada; s_i^2 a variância do k-ésimo tratamento; N_T o total de dados amostrados; NE o numeo de dados amostrais do k-ésimo tratamento; k o numero de tratamentos.

2.9.3.2 Estatística de Cochran

A estatística de Cochran é utilizada para comparar a maior variância amostral s^2_{max} com as demais variáveis s_i^2. Neste teste, rejeita-se a hipótese nula (Equação 2.101) se $C_{calc} > C_{(\alpha;k;n)}$, sendo C_{calc} calculado a partir da Equação 2.105.

$$C = s^2_{max} / \sum_{i=1}^{k} s_i^2 \tag{2.105}$$

2.9.3.3 Estatística de Hartley

A estatística de Hartley é utilizada para comparar a maior e menor variância, conforme apresentado na Equação 2.106. Se o valor de F_{max} está próximo de 1, então as variâncias são consideradas homogêneas. Caso contrário, rejeita-se H_0 (Equação 2.101) se $F_{max(n-1;k)} < F_{max}$.

$$F_{max} = \frac{s^2_{max}}{s^2_{min}} \tag{2.106}$$

2.9.4 Testes de normalidade das observações

Para a avaliação da veracidade da suposição de que os dados seguem uma distribuição normal utilizam-se os testes de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilk, sob a hipótese nula (Equação 2.107).

$$\begin{gathered} H_0: Os\ dados\ seguem\ uma\ distribuição\ normal \\ H_1: Os\ dados\ não\ seguem\ uma\ distribuição\ normal \end{gathered} \tag{2.107}$$

2.9.4.1 Teste de Kolmogorov-Smirnov

O teste de Kolmogorov-Smirnov (Equação 2.108) é utilizado para observar a máxima diferença absoluta entre a função de distribuição acumulada assumida para os dados, no caso a Normal, e a função de distribuição empírica dos dados, que foi comparada a um valor crítico para dado nível de significância. Para realizar o teste os dados são ordenados de tal forma que $x_1 \leq x_2 \leq \ldots \leq x_n$.

$$D_n = \underset{x}{max} |F(x) - F_n(x)| \tag{2.108}$$

sendo F(x) a função de distribuição acumulada assumida para os dados e $F_n(x)$ a função acumulada empírica dos dados, calculada pela Equação 2.109.

$$F_n(x) = \begin{cases} 0, x < x_1 \\ \frac{k}{n}, x_k \leq x < x_{k+1} \\ 1, x \geq x_n \end{cases} \tag{2.109}$$

A hipótese nula (Equação 2.107) é rejeitada se $\max_x |F(x) - S_n(x)| \leq D_{n,\alpha}$, sendo $D_{n,\alpha}$ um valor crítico tabelado.

2.9.4.2 Teste de Lilliefors

Os cálculos do teste de Kolmogorov-Smirnov são igualmente utilizados pelo teste de Lilliefors, sendo diferente apenas a tabela de valores críticos. Neste caso, os valores são menores, sendo menos provável que uma amostra seja normalmente distribuída.

2.9.4.3 Teste de Shapiro-Wilk

O teste de Shapiro-Wilk é baseado na estatística W (Equação 2.110), cujo valor calcula-se a partir das Equações 2.111 e 2.112.

$$W = \frac{b^2}{SS} \tag{2.110}$$

$$b = \sum_{i=1}^{m} a_i (x_{n+1-i} - x_i)^2 \tag{2.111}$$

$$SS = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2 \tag{2.112}$$

sendo x_i os valores das amostras, ordenados de forma crescente.

Na Equação 2.79, m = n/2 se n é par e m = (n – 1)/2 se n é ímpar. Os valores de a_i são tabelados em função de n. A partir do valor de W calculado foi encontrado o valor de p tabelado, rejeitando-se H_0 (Equação 2.107) quando o p-valor foi menor que o nível de significância (α) estabelecido.

2.9.5 Comparações múltiplas em seguida à ANOVA

Os testes de Fisher MDS, Tukey DHS e Duncan são realizados para avaliar quais pares de médias são estatisticamente diferentes entre si, nos casos em que $F > F_{\alpha,a-1,a(n-1)}$.

2.9.5.1 Teste de Mínima Diferença Significativa de Fisher

A partir da estatística t (Equação 2.113), o teste Mínima Diferença Significativa (MDS) de Fisher é usado na comparação de todos os pares de médias, sob a hipótese nula H_0: $\mu_i = \mu_j$ (para todo i ≠ j).

$$t_0 = \frac{\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{j.}}{\sqrt{\frac{2MQ_E}{n}}} \tag{2.113}$$

Sob a hipótese alternativa bilateral, o par de médias será significativamente diferente se $\left|\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{j.}\right| > MDS$, sendo o valor MDS (Equação 2.114) calculado de acordo com $t_{\alpha/2,a(n-1)}$ tabelado.

$$MDS = t_{\alpha/2,a(n-1)}\sqrt{\frac{2MQ_E}{n}} \tag{2.114}$$

2.9.5.2 Teste de Diferença Honestamente Significativa de Tukey

O teste de Diferença Honestamente Significativa (DHS) de Tukey é utilizado para definir a menor diferença significativa a partir da amplitude da distribuição t-*Student* (Equação 2.115), utilizando-se a média quadrática do erro (MQ_E) e o número de réplicas de cada nível (n).

$$q = \frac{\bar{y}_{max} - \bar{y}_{min}}{\sqrt{\frac{QM_E}{n}}} \tag{2.115}$$

Rejeita-se a hipótese nula quando o valor absoluto de duas diferenças amostrais ($\bar{y}_i - \bar{y}_j$) ultrapassar o valor de TSD, sendo este calculado com base no valor tabelado $q_\alpha(k, N-k)$ (Equação 2.116).

$$TSD = q_\alpha(k, N-k)\sqrt{\frac{QM_E}{n}} \tag{2.116}$$

2.9.5.3 Teste múltiplo de Duncan

O teste múltiplo de Duncan é utilizado para comparar a amplitude do conjunto de médias amostrais com a amplitude studentizada mínima significante (R_k), apresentada na Equação 2.117. Para tanto, as *k* médias dos níveis foram dispostas em ordem crescente e testadas aos pares, iniciando-se pelos níveis com a maior e a menor média. A partir deste teste, as médias foram consideradas significativamente diferentes se $\bar{y}_{max} - \bar{y}_{min} > R_k$.

$$R_k = r_{(\alpha,k,df)}\sqrt{\frac{MQ_E}{N}} \tag{2.117}$$

2.10 Considerações finais

Neste capítulo foram apresentados os conceitos básicos e fundamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho, que abrangeram a modelagem fenomenológica de bioprocessos, modelagem de hidrodinâmica e da transferência de massa de PBRs, projeto e construção de PBRs, cultivo e fisiologia de microalgas, teoria geral de sistemas, estimação de parâmetros, algoritmo genético e análises estatísticas.

CAPÍTULO 3 – ESTADO DA ARTE

3 - Estado da arte

3.1 Cultivo de microalgas em sistema fechado

O cultivo de microalgas em laboratórios teve início há aproximadamente 140 anos, sendo que sua produção comercial não iniciou até cerca de 80 anos depois, conforme apontado por Borowitzka (2013). Embora existam trabalhos anteriores (DAVIS *et al.*, 1953; SETLIK *et al.,* 1967), os PBRs fechados começaram a receber a atenção de pesquisadores a partir dos anos 80, quando Gudin (1976) construiu um PBR tubular de 64 mm de diâmetro, com comprimento total de 1500 m, chegando a uma produção de 20 a 25 g m^{-2} dia^{-1} de *Porphyridium cruentum*. O mesmo tipo de PBR foi estudado por Pirt e colaboradores (1983), com 52 tubos de 1 cm de diâmetro e 1 metro de comprimento, utilizados para a produção de *Chlorella.*

Os estudos com PBRs de placas planas tiveram início com o trabalho de Davis e colaboradores (1953), que propuseram uma bandeja horizontal com balanço, com altura média e mínima de cultura de 1,7 e 0,5 cm, respectivamente. Após aproximadamente 30 dias de cultivo, a concentração de biomassa chegou a 13,6 g L^{-1}, utilizando-se luz solar. O mesmo *design* foi utilizado por Barnier e colaboradores (1990) para o a produção de carboidratos a partir de *Porphyridium cruentum*. Um PBR de placas planas vertical com placas a 4 cm de distância foi proposto por Samson e LeDuy (1985) para o cultivo de *Spirulina maxima* com lâmpadas fluorescentes. Os autores alcançaram concentração máxima de biomassa de aproximadamente 1,6 g L^{-1} em 7 dias de cultivo, com injeção de ar puro a 0,5 vvm.

PBRs com designs mais sofisticados foram propostos nos próximos anos (ORTEGA & ROUX, 1986; HU *et al*., 1998b; TREDICI *et al*., 1991; TREDICI & MATERASSI, 1992; HU *et al*., 1996; PULZ, 2001; ZHANG *et al.,* 2002). Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido realizados utilizando-se PBRs de placas planas (SU *et al*., 2010; FENG *et al*., 2011; TAMBURIC *et al*., 2011; ZHANG *et al*., 2013; HUANG *et al*., 2014; KANDILIAN *et al*., 2014; EZE *et al*., 2017; HULATT *et al*., 2017; CORRÊA *et al*., 2018; KHADIM *et al*., 2018; KOLLER *et al*., 2018; XIA *et al*., 2018).

Um PBR de placas planas com 1 cm distância entre as placas foi utilizado por Kandilian e colaboradores (2014) para a produção de *Nannochloropsis oculata*. Uma mistura de ar e CO_2 foi injetada a 0,1 vvm, e a cultura foi mantida em suspensão pela utilização de

um agitador orbital a 100 rpm. A intensidade luminosa foi mantida em 165 μmol m^{-2} s^{-1} em ambos os lados do PBR. Nestas condições, os autores alcançaram uma concentração máxima no PBR de 2,08 g L^{-1}. No mesmo ano, Wang e colaboradores (2014) utilizaram um PBR de placas planas com 3,51 cm de distância entre as placas para o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (FACHB 9). A intensidade luminosa foi de 150 μmol m^{-2} s^{-1} em ambos os lados do PBR, e uma mistura de ar com 2% de CO_2 foi injetada a 0,42 vvm. Nestas condições, foi alcançado uma concentração máxima de biomassa de 0,91 g L^{-1}.

Utilizando simulações a partir da FDC, Huang e colaboradores (2015) propuseram defletores para aumentar a produtividade de um PBR de placas planas com 42 mm de distância entre as placas. A intensidade luminosa em ambos os lados dos PBRs foi mantida em 108 μmol m^{-2} s^{-1}, e ar com 2% de CO_2 foi injetado a 0,6 vvm. A adição dos defletores proporcionou um aumento de mais de 30% na concentração final de biomassa, quando comparado ao controle, passando de 0,67 a 0,89 g L^{-1}.

A partir de um PBR de placas planas posicionadas a 8 cm de distância, Sun e colaboradores (2016) alcançaram 1,11 g L^{-1} de *Chlorella vulgaris* FACHB-31, empregando 70 μmol m^{-2} s^{-1} de intensidade luminosa e 5 % de CO_2 a 0,15 vvm. Além disso, para melhorar a penetração da luz no interior do PBR, os autores propuseram a adição de tubos refletores internos, que aumentaram a produção de biomassa em mais de 20%, chegando a 1,37 g L^{-1}.

Em 2018, XIA e colaboradores propuseram um PBR de placas planas com um módulo interno para aumentar a solubilidade de CO_2 no meio e 6 cm de distância entre as placas. Com intensidade luminosa de 180 μmol m^{-2} s^{-1} e 15% de CO_2 injetado a 0,02 vvm, os autores alcançaram um máximo de 3,35 g L^{-1}.

3.2 Utilização das microalgas

A biomassa de microalgas pode ser utilizada para diversos fins, sendo que nas últimas décadas as suas aplicações têm sido amplamente estudadas, conforme apresentado detalhadamente por Levine e Fleurence (2018). Neste âmbito, Spolaore e colaboradores (2006) realizaram uma pesquisa bem detalhada acerca da utilização comercial da biomassa microalgal. Já Pulz e Gross (2004) apresentaram detalhadamente a produção de produtos com alto valor agregado a partir de tecnologias de microalgas. Algumas das aplicações mais importantes estão apresentadas a seguir.

3.2.1 Nutrição humana e animal

A biomassa de microalgas é fonte importante de proteínas, carboidratos, enzimas, vitaminas A e C e minerais, como o iodo, potássio, ferro e cálcio (RAHEEM *et al*., 2015). Além disso, as microalgas podem ser utilizadas como fonte de aminoácidos essenciais, já que suas células são capazes de sintetizá-los (GUIL-GERRERO *et al*., 2004). Por isso as microalgas são utilizadas na alimentação humana desde centenas de anos em países asiáticos: China, Japão e Coréia (SPOLAROE, 2006). São inúmeros os estudos de utilização da biomassa de microalgas para a alimentação ou suplemento humano (GRAZIANI *et al*., 2013; SAMARAKOON *et al*., 2014; KENT *et al*., 2015; EJIKE *et al*., 2017; HAYES, *et al*., 2017; MATOS *et al*., 2017; RIZWAN *et al*., 2018), e como suplemento alimentar animal (CHRISTENSON & SIMS 2011; VANDAMME *et al*., 2012; DIN & EL-SHERIF, 2012; DUONG *et al*.,2015; FURBEYRE, *et al*., 2017; PACHECO-VEGA *et al*, 2018).

3.2.2 Produtos farmacêuticos, cosméticos e química fina

Em concentração suficiente, moléculas puras podem ser extraídas e isoladas a partir da biomassa de microalgas (SPOLAORE *et al*., 2006), sendo que algumas apresentam alto valor agregado, como pigmentos (MACINTYRE, *et al*., 2002; DUFOSSÉ *et al*., 2005; PASQUET *et al*., 2011; HU *et al*., 2018; RAMANNA, *et al*., 2018), ácidos graxos poli-insaturados (THEPENIER *et al*., 1994; FURUHASHI *et al*., 2016), compostos biologicamente ativos – antibacterianos, antifúngicos, antiviral, antitumorais (BOROWITZKA, 1995; MENDES *et al*, 2003; ÖRDÖG *et al*., 2004; MIMOUNI *et al*., 2012; SKJÅNES *et al*., 2013, MARTÍNEZ ANDRADE *et al*., 2018; NEUMANN *et al*., 2018) entre outros.

3.2.3 Biocombustíveis

Os combustíveis produzidos a partir de biomassa de microalgas são chamados de combustíveis de terceira geração. Quando comparadas com plantas terrestres, as microalgas podem produzir de 30 a 100 vezes mais energia por hectare (DEMIRBAS, 2010), o que diminui a questão de espaço para plantação. Além disso, por se tratar de uma fonte renovável

de matéria-prima, elas constituem uma alternativa promissora para a iminente escassez de petróleo. Existem diversos biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de microalgas, como o biodiesel (SHEEHAN *et al.*, 1998; KOKKINOS *et al*., 2015; CHENG *et al*., 2015; SHARMA, *et al*., 2016; MARANDUBA *et al*., 2016; ISLAM *et al*., 2017; PILOTO-RODRÍGUEZ *et al*, 2017; HE *et al*., 2018), bioetanol (FASAHATI *et al*., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2015; SIMAS-RODRIGUES *et al*., 2015; SAÏDANE-BCHIR *et al*., 2016; KIM *et al*., 2017; REYIMO & ÍZŠIMEN, 2017; PHWAN *et al*., 2018; SMACHETTI *et al*., 2018), biohidrogênio (SAMBUSITI *et al*., 2015; TORZILLO *et al*., 2015; EROGLU E MELIS, 2016; NAGARAJAN *et al*., 2018) e biogás (KLASSEN *et al*., 2015; NEVES *et al*., 2016; SANTOS-BALLARDO *et al*., 2016; MEIER *et al*., 2017).

3.2.4 Tratamento de águas residuais e efluentes industriais

Por meio do cultivo heterotrófico ou mixotrófico, as microalgas podem consumir o carbono orgânico de diferentes fontes, atuando assim na remoção de poluentes de águas residuais e efluentes industriais. Conforme apontado por diversos autores (ESCAPA *et al*., 2016; HEMALATHA e MOHAN, 2016), as microalgas podem ser utilizadas no tratamento de águas contendo produtos farmacêuticos. Já Park e colaboradores (2013) abordaram a utilização das microalgas para a remoção de metais provenientes da drenagem ácida de minas. O tratamento de águas residuais provenientes da agricultura foi estudado por Chiu e colaboradores (2015). Além desses, diversos autores abordaram a biorremediação de águas residuais e efluentes industriais (SILVA-BENAVIDES e TORZILLO, 2012; FRAMPTON *et al*., 2013; PARK *et al*., 2013; FAZAL *et al*., 2017).

3.3 *Posterioochromonas malhamensis*

As células de *Posterioochromonas malhamensis* são esféricas, com diâmetro médio de 8 a 10 μm, são flageladas e vivem isoladas. São espécies conhecidas por apresentarem a capacidade de metabolizar carbono inorgânico, em cultivos fotoautotróficos, bem como bactérias ou até mesmo outras algas, em um cultivo mixotrófico (CARON, *et al.*,1990).

Com relação ao metabolismo celular, Sanders e colaboradores (1990) reportaram que esta espécie utiliza carbono orgânico na forma de bactérias. Por outro lado, quando o carbono

orgânico é extinto do meio, as células passam a utilizar o carbono inorgânico, em um cultivo fotoautotrófico. De acordo com Chen e colaboradores (1994), extratos de *Poterioochromonas malhamensis* podem inibir a proteína tirosina quinase, além de exibirem atividade antiviral e antimicrobiana.

3.4 Considerações finais

No Capítulo 3, foi verificado que a biomassa de microalgas possui uma ampla gama de aplicações, que vão desde a sua utilização na extração de lipídeos para a produção de biocombustíveis, até na produção de compostos com alto valor agregado, como cosméticos e compostos biologicamente ativos.

Os PBRs de placas planas são amplamente utilizados, podendo produzir altas concentrações de biomassa, principalmente com pequenas distâncias entre as placas. Para que se possa produzir culturas com alta densidade celular em PBRs com espessuras maiores e consequentemente volumes maiores, é necessário o emprego de técnicas mais sofisticadas, como por exemplo o desenvolvimento de melhorias com o auxílio da FDC e o estudo detalhado da fisiologia microalgal.

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4 - Materiais e métodos

4.1 Projeto e construção dos fotobiorreatores

Foram projetados dois PBRs de placas planas, com volumes de cultura e razões A/V (área da superfície iluminada / volume de líquido) diferentes. As dimensões dos PBRs foram escolhidas de acordo com o espaço físico disponível para sua instalação, o volume útil desejado, e a razão A/V. As características particulares de cada PBR (chamados de PBR_1 e PBR_2) e seus esquemas estão apresentados na Tabela 4.1 e Figura 4.1, respectivamente.

Tabela 4.1 – Parâmetros de construção dos PBRs

Parâmetro	**Unidade**	**PBR_1**	**PBR_2**
Altura	m	0,23	0,6
Largura	m	0,17	0,4
Profundidade	m	0,03	0,05
Razão A/V	m^{-1}	33,3	20
V_{total}	L	1,17	12
V_{util}	L	1	10
Material	–	Vidro – 3 mm	Vidro – 5 mm

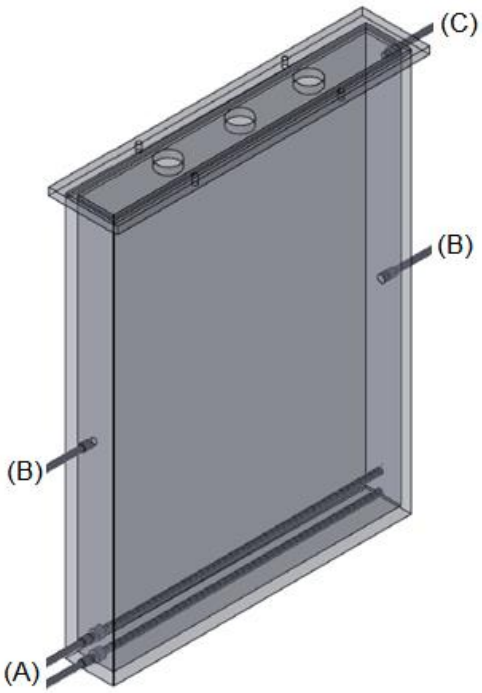

Figura 4.1 – Projeto do PBR1 e PBR2: (A) entrada de gás; (B) retirada de amostra e (C) saída de gás.

Foi instalada uma válvula globo no fundo do reator para facilitar a limpeza, e duas saídas de amostras nas laterais dos reatores como mostra a Figura 4.1-B. A tampa de todos os PBRs foi construída com três orifícios abertos para a aferição da temperatura, pH e adição de água ou nutrientes. Durante o cultivo esses orifícios foram mantidos fechados por rolhas de látex.

4.1.1 Sistema de injeção de gás

Conforme apresentado na Figura 4.2, o sistema de injeção de gás consistiu-se em um compressor de ar isento de óleo (Figura 4.2-B) e um cilindro de CO_2 comprimido (Figura 4.2-A). Depois de comprimido, o ar passou por um filtro odontológico triplo a fim de eliminar qualquer contaminação por microrganismos ou partículas suspensas. Ambas as correntes (CO_2 e ar) seguiram por mangueiras de poliuretano de 6 mm de diâmetro e passaram por fluxômetros antes de serem unidas e injetadas nos PBRs.

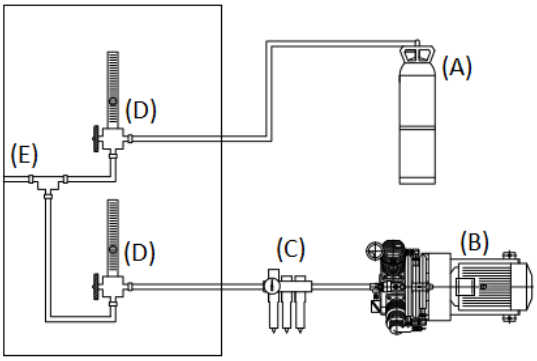

Figura 4.2 – Sistema de gás: (A) cilindro de CO_2 comprimido; (B) compressor de ar odontológico; (C) filtro de ar odontológico; (D) fluxômetro e (E) entrada para o PBR.

4.1.2 Sistema de iluminação

Para o sistema de iluminação construíram-se dois módulos de cultivo, divididos em 9 câmaras com diferentes configurações de lâmpadas (Figura 4.3). A disposição das lâmpadas e reatores em cada câmara é apresentada na Tabela 4.2. Cada módulo possui o seu painel de energia, onde foram fixados os reatores das lâmpadas e a caixa de energia com os interruptores e disjuntores. Todas as lâmpadas foram instaladas na horizontal, com distância média de 3 cm entre si. Os reatores tubulares apresentados nas câmaras A3 e A4 (Figura

4.3), referem-se à provetas de 250 mL utilizadas para cultivos em pequena escala, como a ativação das células, estudos de meios de cultivo, da composição centesimal, entre outros.

Tabela 4.2 – Configuração dos módulos experimentais

Câmara	Lâmpada				PBR	
	Tipo*	Potência (W)	Quantidade	Disposição	Tipo	Quantidade
A1	F	30	2	Posterior	_	_
A2	F	30	10	Posterior	PBR_2	2
	VM	2000	1	Frontal		
A3	F	30	4	Posterior	Coluna	8
	F	20	4	Frontal		
A4	F	30	4	Posterior	Coluna	8
	F	20	4	Frontal		
B1	F	30	2	Posterior	_	_
B2	F	30	4	Posterior	PBR_1	3
	VM	2000	1	Frontal		
B3	F	30	4	Posterior	PBR_1	3
	VM	2000	1	Frontal		
B4	F	30	4	Posterior	PBR_1	3
	VM	2000	1	Frontal		
B5	F	30	4	Posterior	PBR_1	3
	VM	2000	1	Frontal		

* F – fluorescente; VM – vapor metálico

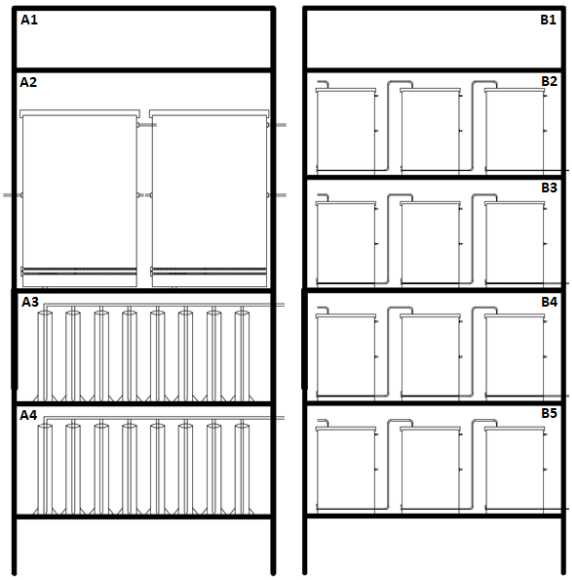

Figura 4.3 – Esquema dos módulos experimentais construídos para a iluminação dos PBRs

4.1.3 Módulo para otimização dos ciclos claro/escuro

Com o intuito de estudar o fluxo dos fluidos no interior do PBR_2, foram propostos dois módulos de dispersão de bolhas diferentes, conforme apresentado na Figura 4.4. O módulo apresentado na Figura 4.4-B consistiu-se em placas horizontais com aberturas retangulares de 2 por 38 cm, posicionadas de lados opostos com relação às paredes iluminadas. Já no módulo da Figura 4.4-C, as aberturas constituíram-se de duas linhas de orifícios de 3 mm de diâmetros posicionados com 3 mm de distância entre si. Nas duas situações, as placas foram posicionadas horizontalmente a uma distância de 10 cm entre si. A partir daí, foram estudadas as seguintes configurações: PBR_A – sem a adição de módulo interno (Figura 4.4-A); PBR_B – módulo sem orifícios (Figura 4.4-D); e PBR_C – módulo com orifícios (Figura 4.4-E).

A partir dos resultados obtidos por meio do estudo da hidrodinâmica dos PBRs, o módulo que apresentou o melhor fluxo foi construído em acrílico de 4 mm e disposto no interior do PBR de 10 L para testes experimentais.

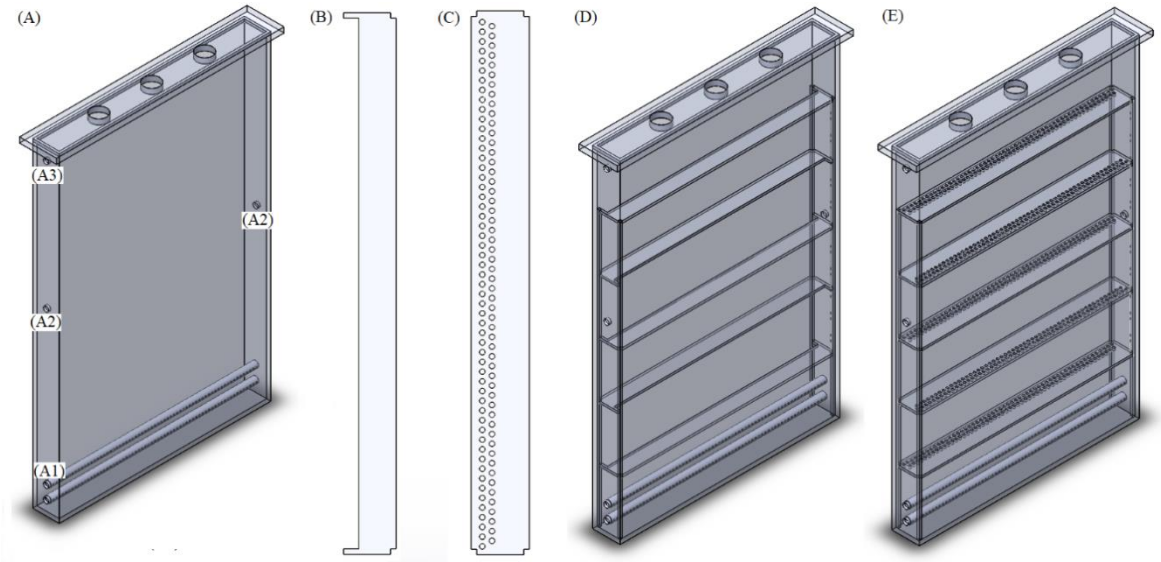

Figura 4.4 – Esquemas das configurações de dispersão de bolhas propostas para o estudo da hidrodinâmica: (A) PBR_A; (B) e (C) módulos de dispersão de bolhas dos PBR_B (D) e PBR_C (E), respectivamente.

4.2 Preparo de inóculo

4.2.1 Meios de cultivo utilizados

Os meios de cultivo utilizados durante o estudo foram o BG-11 (STANIER *et al*., 1971), o M-8 (MANDALAM & PALSSON, 1998) e o M-8 modificado (M-8_{mod}), cujas composições são apresentadas a seguir:

- BG-11 (mg L^{-1}): $NaNO_3$ 1,5 10^3; K_2HPO_4 40; $MgSO_4.7H_2O$ 75; $CaCl_2.2H_2O$ 36; ácido cítrico.H_2O 6; citrato de amônio e ferro III 6; $Na_2EDTA.2H_2O$ 1; Na_2CO_3 20; H_3BO_3 2,86; $MnCl_2.4H_2O$ 1,81; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,22; $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0,39; $CuSO_4.5H_2O$ 7,9 10^{-2}.
- M-8 (mg L^{-1}): KNO_3 3,0 10^3; KH_2PO_4 740; $Na_2HPO_4.2H_2O$ 260; $CaCl_2.2H_2O$ 13; Fe-EDTA 10; $FeSO_4.7H_2O$ 130; $MgSO_4.7H_2O$ 400; $Al_2(SO4)_3.18H_2O$ 3,58; $MnCl_2.4H_2O$ 12,98; $CuSO_4.5H_2O$ 1,83; $ZnSO_4.7H_2O$ 3,2.
- M-8_{mod} (mg L^{-1}): Ureia 300; $(NH_4)_2SO_4$ 660; NH_4NO_3 400; KH_2PO_4 740; $CaCl_2.2H_2O$ 13; $FeSO_4.7H_2O$ 130; $MgSO_4.7H_2O$ 400; $MnCl_2.4H_2O$ 12,98; $CuSO_4.5H_2O$ 1,83; $ZnSO_4.7H_2O$ 3,2.

4.2.2 Microalga utilizada

A fase de obtenção da cepa estudada compreendeu três etapas: a coleta, o isolamento e a identificação da espécie isolada.

4.2.2.1 Coleta

A cepa de microalga utilizada neste estudo foi coletada de um corpo de água localizado na cidade de Toledo, região oeste do Paraná. Realizou-se a coleta em frascos esterilizados e as amostras foram armazenadas em refrigerador até sua inoculação.

4.2.2.2 Isolamento

As amostras coletadas foram analisadas em microscópio óptico a fim de identificar a presença de células de microalgas. As amostras que apresentaram células foram diluídas em meio BG-11 (1:1) e incubadas em presença de luz com intensidade de 56 a 70 μmol m^{-2} s^{-1}. Ar enriquecido com CO_2 (2%) a uma vazão de 2 L L^{-1} min^{-1} foi injetado em todas as amostras. As culturas foram mantidas nestas condições por 5 a 7 dias para permitir a multiplicação das células presentes nas amostras coletadas. Após o período de incubação, as amostras foram novamente analisadas em microscópio para verificar se houve multiplicação das células e, nos casos positivos, as mesmas seguiram para a próxima etapa.

O plaqueamento em superfície foi utilizado para o isolamento das células. Para tanto, o meio sólido foi preparado a partir de 500 mL de meio BG-11 com quantidade de nutrientes referentes à 1 L de solução, e 500 mL de solução de ágar (15 g L^{-1}), dissolvida a 50 °C. Ambas as soluções foram misturadas a 50 °C e distribuídas nas placas de Petri. As placas foram então dispostas em refrigerador por 24 h antes de serem utilizadas. Para o plaqueamento, 100 μL de cada amostra foi inoculada com o auxílio de uma alça de platina esterilizada. A inoculação foi realizada pelo método de estriamento, conforme apresentado na Figura 4.5. As placas inoculadas foram incubadas por 20 dias em presença de luz com intensidade de 40 μmol m^{-2} s^{1}.

Após este período, as culturas do último quadrante estriado foram coletadas com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e ressuspensas em erlenmeyers contendo 50 mL de meio BG-11. Os Erlenmeyers foram incubados por 5 dias nas mesmas condições das amostras coletadas, antes de serem novamente avaliadas em microscópio óptico para verificação da unicidade de espécies. Este procedimento foi realizado tantas vezes quanto necessário para se obter uma cultura com apenas um tipo celular, não axênico.

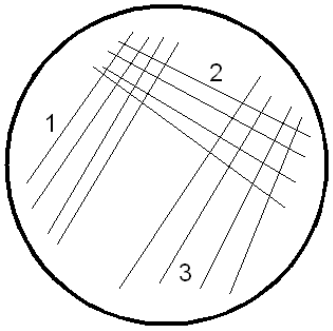

Figura 4.5 – Representação do método de inoculação por estriamento

4.2.2.3 Identificação molecular

A identificação da espécie isolada foi realizada pelo grupo de pesquisa a partir da análise do DNA celular. Para tanto, o DNA foi extraído e purificado pelo método CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980), amplificado pelo método da reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciado. Por fim, a sequência de bases obtida foi comparada com informações depositadas em bancos de dados de sequências de DNA e proteínas. O procedimento detalhado está descrito no Anexo A.

4.2.3 Manutenção das células

As células foram mantidas em placas de Petri contendo o meio BG-11 com ágar. As placas ficaram incubadas em câmara de germinação (NI-4101 New Lab) a temperatura ambiente com iluminação constante de 28 μmol m^{-2} s^{-1}.

4.2.4 Cultivo de ativação

Os cultivos de ativação foram realizados em erlenmeyers de 125 mL em incubadora agitadora horizontal (Cienlab), sob agitação de 65 rpm e intensidade luminosa constante de aproximadamente 30 μmol m^{-2} s^{-1}, com meio de cultivo M-8_{mod}.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Obtenção da concentração celular

A concentração celular foi obtida tanto pelo método da massa seca quanto pela densidade óptica, conforme descrito a seguir:

- A massa seca (Equação 4.1) foi estimada em triplicata utilizando-se uma membrana de fibra de vidro GF-6 (47 mm de diâmetro e 1,2 μm de diâmetro de poro) marca Macherey-Nagel. Inicialmente a membrana foi seca em estufa a 105°C por 2 h. Após,

ela foi disposta em um dessecador com sílica gel até atingir a temperatura ambiente, e posteriormente ela foi pesada (m_1). Um volume de 10 mL de amostra foi filtrado com auxílio de vácuo, cuja membrana contendo a biomassa foi novamente seca em estufa a 105°C por 2 h. Depois, ela foi disposta em dessecador para resfriar, e então sua massa (m_2) foi novamente aferida.

$$MS(g\ L^{-1}) = 100\ (m_2 - m_1) \quad (4.1)$$

- A densidade óptica da suspensão celular foi aferida em triplicata em espectrofotômetro (Pró-Análise V-1100D) em 682 nm. O comprimento de onda foi determinado a partir do espectro de varredura de meios com diferentes concentrações celulares (ver Apêndice A). Diluições adequadas foram feitas para manter a linearidade da absorção abaixo de 1 unidade. Após, construiu-se a curva padrão que relaciona a concentração celular com a absorbância (ver Apêndice A).

4.3.2 Composição elementar da biomassa

A concentração elementar da amostra foi determinada por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-EOS) (Optima 7000 DV, Perkin-Elmer). O *software* Optima WinLab32® foi utilizado para controlar os parâmetros da análise e geração dos resultados. A resposta do ICP-OES foi primeiramente calibrada contra padrões de composição conhecida que continha os analitos avaliados. A calibração em branco e os padrões foram preparados em ácido nítrico a 2%. A concentração de nitrogênio foi obtida por decomposição da amostra (digestão em H_2SO_4 concentrado em presença de sulfato de cobre), sendo ela mantida a 50°C por 30 min. A temperatura foi aumentada em 50°C a cada 30 min até atingir os 400°C, condição em que a amostra ficou por 1 h. O nitrogênio presente na solução ácida resultante da digestão foi determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com solução de HCl 0,1 N.

4.3.3 Intensidade luminosa e concentração de CO_2 e O_2

A intensidade luminosa foi medida utilizando-se um luxímetro (Instrutherm, modelo LD-400). A concentração de CO_2 (%) na corrente de entrada de ar foi medida por meio do leitor analógico Bacharach Fyrite. Para tanto, o gás (ar + CO_2) foi bombeado para dentro do

medidor, e a leitura foi feita em uma escala que aponta a dilatação de um líquido pela absorção do CO_2. As concentrações de CO_2 e O_2 dissolvidos no meio foram obtidas a partir de sondas acopladas a um biorreator (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO., New Jersey, USA).

4.3.4 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl. Para tanto foram adicionados 100 mg de biomassa seca e 5 mL de solução digestora (em 1 L: ácido sulfúrico P.A. – 500 mL; sulfato de cobre – 20g; selenito de sódio – 9 g; sulfato de sódio – 52,5 g) a tubos digestores, que foram aquecidos a 50°C. A temperatura foi aumentada até 450°C de 30 em 30 min da seguinte forma: 50°C – 30 min; 100°C – 30 min; 150°C – 30 min; 250°C – 30 min; 350°C – 30 min; 450°C – 30 min. Após resfriar até temperatura ambiente foram adicionados 15 mL de água destilada a cada tubo.

Para a digestão da amostra foram adicionados 20 mL de NaOH 18 N ao destilador e 10 mL da solução receptora (em 1 L: 20 g de ácido bórico; 15 mL de vermelho de metila a 1 g L^{-1}; 6 mL de verde de bromocresol a 1 g L^{-1}) a erlenmeyers de 125 mL. O tubo digestor foi acoplado ao equipamento e a destilação foi realizada até o volume de 75 mL no erlenmeyer. A titulação foi feita com ácido sulfúrico 0,05 M, de verde para rosa.

4.3.5 Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al*., 1973), sendo 5 mg de biomassa pesadas em um tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de NaOH 1 N. O tubo foi aquecido a 100°C por 1 h, sendo posteriormente resfriado (em repouso) até temperatura ambiente. A amostra foi então centrifugada a 3000 rpm por 10 min e 100 µL do extrato (sobrenadante) foi transferido a outro tubo. A este tubo foram então adicionados 500 µL de fenol 5% (v/v) e 1 mL de NaOH 1 N. A amostra ficou em repouso por 30 min. Após este período foram adicionados 5 mL de H_2SO_4 concentrado. Após atingir a temperatura ambiente, a absorbância da amostra foi aferida em 485 nm. A curva padrão de glicose foi utilizada para correlacionar a absorbância com a concentração de carboidratos.

4.3.6 Determinação de lipídeos

Para a determinação de lipídeos foi utilizada a metodologia de extração com solvente orgânico acoplado ao ultrassom. Conforme apontado por Viêgas (2010), este método apresentou bons resultados para células de *Chlorella pyrenoidosa* utilizando-se o metanol como solvente. Assim, 100 mg de biomassa seca foram pesadas em microtubos de 2 mL. A cada tubo foi adicionado 1 mL de metanol e as amostras foram sujeitas a 20 min em banho de ultrassom a 45 Hz. Após, as amostras foram centrifugadas a 7200 rpm por 5 min e o sobrenadante foi retirado e adicionado à frascos previamente pesados. Os frascos foram secos em estufa a 60°C, resfriados em dessecador e novamente pesados.

4.3.7 Determinação de pigmentos

Para a determinação de clorofila-a e clorofila-b, 10 mL de cultura foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min e congeladas por 24 h em tubos protegidos da luz. Após o descongelamento das amostras, adicionou-se 10 mL de solução de acetona 80% saturada com Na_2CO_3, mantendo-se os tubos em banho de gelo. Os tubos foram agitados em vórtex até a homogeneização completa da amostra, e foram então centrifugados a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado e sua absorbância foi aferida em 663,6; 646,6; 470 e 720 nm, contra o branco de acetona 80%. As concentrações de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides foram respectivamente estimadas conforme as Equações 4.2, 4.3 e 4.4 (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001).

$$Cl_a = 12{,}25\left(A_{663{,}6} - A_{720}\right) - 2{,}55\left(A_{646{,}6} - A_{720}\right) \quad (4.2)$$

$$Cl_b = 20{,}31\left(A_{646{,}6} - A_{720}\right) - 4{,}91\left(A_{663{,}6} - A_{720}\right) \quad (4.3)$$

$$Ct = \frac{1000(A_{470} - A_{720}) - 1{,}82Cl_a - 85{,}02Cl_b}{198} \quad (4.4)$$

sendo Cl_a clorofila-a (μg mL^{-1}); Cl_b clorofila-b (μg mL^{-1}); Ct carotenoides (μg mL^{-1}); A_{470}, $A_{646,6}$, $A_{663,6}$ e A_{720} as absorções em 470, 646,6, 663,6 e 720 nm, respectivamente.

4.4 Estudo do processo de cultivo

Aplicando-se a TGS ao estudo do cultivo da microalga em PBRs de placas planas, este foi considerado como um sistema e dividido em quatro níveis hierárquicos, sendo cada nível dividido em subsistemas (Figura 4.6). Os níveis I, II, III e IV consistiram no estudo do PBR, no estudo da fisiologia celular, na modelagem matemática da cinética de crescimento e na combinação do conhecimento obtido em todos os outros níveis, respectivamente.

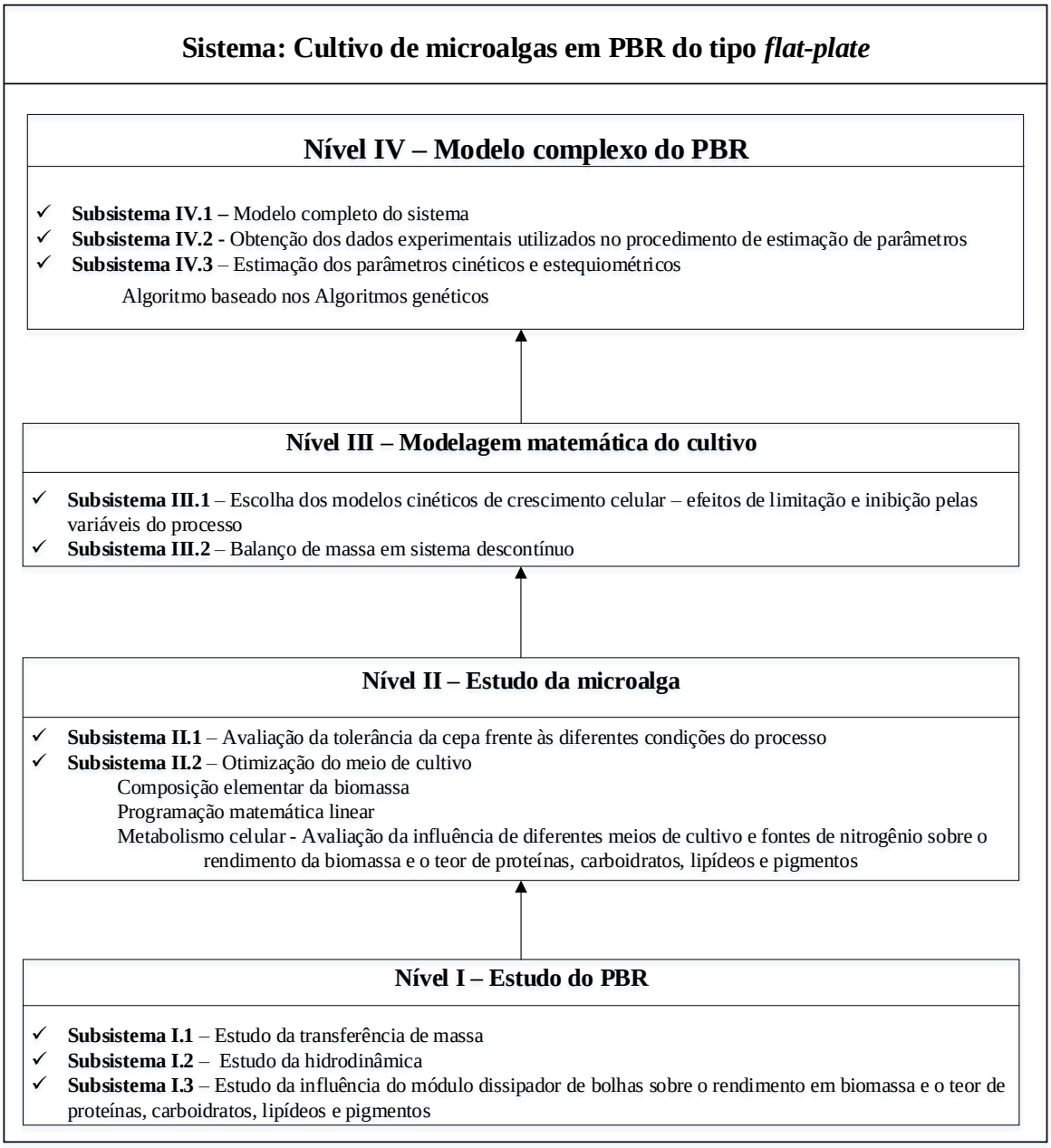

Figura 4.6 – Divisão das etapas do estudo do processo de cultivo de microalgas em PBRs de placas planas

4.4.1 Primeiro nível hierárquico – Estudo do PBR

No primeiro nível hierárquico foram estudados os parâmetros do PBR relacionados à TM entre as fases líquida e gasosa e à hidrodinâmica dos fluidos no interior do reator.

Na modelagem matemática da TM entre duas fases utilizou-se a teoria dos dois filmes estagnados, conforme descrito no tópico 2.5.1. O mesmo conceito foi aplicado à concentração das espécies na fase gasosa. Além disso, o estudo da TM foi realizado utilizando-se ensaios planejados.

As características do fluxo dos fluidos no interior do PBR foram estudadas com o uso da fluidodinâmica computacional (FDC), utilizando-se os modelos disponíveis no *software* Comsol Multiphysics ®.

4.4.1.1 Estudo da transferência de massa

4.4.1.1.1 Modelagem matemática da TM

A teoria dos dois filmes estagnados foi aplicada a fim de se obter equações para descrever teoricamente a TM entre as fases líquida e gasosa. As equações diferenciais obtidas foram posteriormente acopladas à modelagem da cinética de crescimento para o procedimento de estimação de parâmetros do processo.

4.4.1.1.2 Estudo da TM a partir de planejamento experimental

Para caracterizar o PBR_C (ver Figura 4.4) quanto à transferência de massa entre as fases líquida e gasosa, propôs-se um planejamento fatorial fracionado (PFF), para avaliar 4 variáveis (q_i) em 3 níveis (Tabela 4.3), cuja matriz apresenta-se na Tabela 4.4. Os fatores q_1, q_2, q_3 e q_4 representam a vazão de entrada de gás ($Q_{gás}$), a fração de CO_2 no gás de entrada (ϕ_{CO2}), a concentração de antiespuma (C_{AE}) e a fração de salinidade do meio (ϕ_{sal}), respectivamente. As variáveis resposta deste estudo foram os coeficientes volumétricos de transferência de massa para as variáveis O_2 ($K_L a_{O_2}$) e CO_2 ($K_L a_{CO_2}$) e as concentrações de equilíbrio na fase líquida do O_2 (O_2^{eq}) e CO_2 (CO_2^{eq}).

Tabela 4.3 – Variáveis e níveis utilizados no PFF para estudo da transferência de massa

Variáveis	Unidade	Níveis		
		-1	0	+1
q_1: Q_{gas}	L L^{-1} min^{-1}	1	2	3
q_2: ϕ_{CO2}	%	0	30	60
q_3: C_{AE}	mL L^{-1}	0,0	0,1	0,2
q_4: ϕ_{sal}^{*}	%	0	50	100

* O meio M-8_{mod} 3 vezes concentrado foi considerado como 100% de salinidade

Tabela 4.4 – Matriz de ensaios do planejamento PFF

Ensaio	Q_{gas} (L L^{-1} min^{-1})	ϕ_{CO2} (%)	C_{AE} (mL L^{-1})	ϕ_{Sal}
1	2	60	0,0	0
2	2	0	0,1	50
3	2	0	0,0	100
4	2	60	0,1	100
5	2	60	0,2	50
6	1	0	0,2	50
7	3	0	0,0	50
8	1	60	0,0	50
9	3	0	0,1	0
10	3	60	0,2	0
11	1	60	0,1	0
12	1	30	0,1	50
13	2	30	0,0	50
14	2	30	0,1	0
15	3	30	0,2	50
16	3	30	0,1	100
17	1	0	0	0
18	3	60	0,1	50
19	2	0	0,2	0
20	1	0	0,1	100
21	1	30	0,2	0
22	1	30	0,0	100
23	2	30	0,2	100
24	1	60	0,2	100
25	3	30	0	0
26	3	60	0,0	100
27	3	0	0	100
28 – PC	2	30	0,1	50

Para o procedimento experimental, os reatores foram completados com água ou meio de cultivo, de acordo com o ensaio realizado. Foi injetado gás nitrogênio (N_2) até reduzir consideravelmente a concentração dos gases O_2 e CO_2 dissolvidos. Posteriormente, foi injetada a mistura de ar e CO_2 e foi medida a concentração de OD e CO_2 dissolvido em intervalos de tempo de 20 s, até atingir o equilíbrio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

4.4.1.2 Modelagem da hidrodinâmica

As equações utilizadas para descrever a fluidodinâmica no interior do PBR foram obtidas a partir do *software* Comsol Multiphysics ®. As simulações do fluxo dos fluidos no interior do PBR foram realizadas considerando-se um sistema monofásico, com fluxo de água; e um sistema multifásico, com fluxo de gás (bolhas). Esta estratégia foi adotada para a verificação do movimento global do fluido descrito pelas Equações (2.44 e 2.45), sem a turbulência extra gerada pelas bolhas. Como o estudo foi realizado em regime permanente, os termos dependentes do tempo foram desconsiderados. O modelo de turbulência utilizado foi o k-ε (Equações 2.47 a 2.50).

Para descrever o movimento dos fluidos no sistema multifásico, foram utilizadas as Equações 2.56 a 2.58. O modelo de escoamento utilizado foi o de equilíbrio de pressão de arraste, descrito nas Equações 2.59 e 2.60. O coeficiente de tensão superficial foi de 0,07 N m^{-1} (COMSOL, 2013) e o diâmetro das bolhas de 5 10^{-3} m, determinado a partir de observações experimentais. Mais uma vez, o modelo k:ε (Equação 2.63) foi usado para descrever o movimento turbulento, sendo a energia cinética turbulenta (k) e a taxa de dissipação de energia turbulenta (ε) descritas pelas Equações 2.64 e 2.65, respectivamente, com a adição do termo de turbulência induzido por bolhas (S_k), dado pela Equação 2.66. Considerando-se regime permanente, os termos dependentes do tempo foram novamente desconsiderados.

4.4.1.2.1 Simulações da fluidodinâmica computacional

O fluxo dos fluidos no interior dos PBRs foi estudado por meio do *software* Comsol Multiphysics®, utilizando-se as interfaces Fluxo de Fluido Turbulento (*Turbulent Fluid Flow*) para fluxo monofásico, e Fluxo Turbulento de Bolhas (*Turbulent Bubbly Flow*) para

fluxo multifásico. Para a solução do sistema, foi considerada uma geometria 2D conforme apresentado na Figura 4.7, representando um corte lateral dos PBRs de 10 L apresentados na Figura 4.4. As Figuras 4.7-A e B mostram as fronteiras de entrada e saída, respectivamente. Todas as outras paredes foram configuradas como fixas (sem deslize).

A fase líquida foi configurada como sendo água pura, considerando que as propriedades físicas, como viscosidade e densidade, da cultura de microalgas podem ser consideradas como similares àquelas da água. Para as simulações considerando o fluxo de bolhas, a fase gasosa foi configurada como sendo ar. A temperatura foi fixada em 20 °C.

Para a simulação monofásica, a velocidade de entrada da água foi considerada como 0,22 m s^{-1}, enquanto para a simulação multifásica a vazão de entrada de ar foi considerada como 0,3 kg m^{-2} s^{-1}. Ambos os valores foram determinados de acordo com o utilizado experimentalmente.

Para a representação geométrica do volume de estudo, foi gerado um conglomerado de pontos de cálculo, conhecido como malha. A malha foi construída por meio da função Malha Controlada pela Física (*Physics-Controled Mesh)*, com a densidade de pontos configurada como Extra Fina (*Extra Fine)* para as simulações monofásicas, e Mais Fina (*Finer)* para as multifásicas. O número de pontos de cálculo gerados pela interface para cada estudo está apresentado na Tabela 4.5.

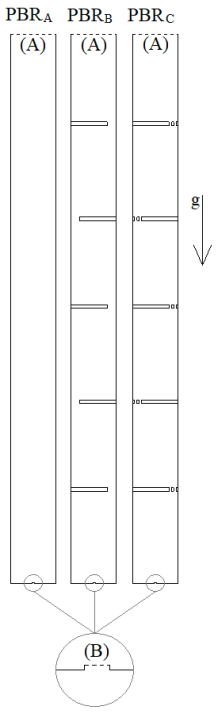

Figura 4.7 – Cortes laterais dos PBRs no estudo da hidrodinâmica: (A) fronteiras de saída e (B) de entrada

Tabela 4.5 – Número de pontos de cálculo gerado para cada caso estudado

Configuração do PBR	Estudo	Elementos de vórtex	Elementos de domínio	Elementos de fronteira
PBR_A	Monofásico	10	347483	3827
	Multifásico		135103	3903
PBR_B	Monofásico	30	290070	5258
	Multifásico		171166	5334
PBR_C	Monofásico	70	408109	6133
	Multifásico		228173	6209

4.4.1.3 Influência do módulo de dispersão de bolhas sobre o crescimento celular

Para a avaliação da influência da utilização do módulo de dispersão de bolhas, foram conduzidos dois experimentos nos PBR_2 com as mesmas condições operacionais, exceto pela presença do módulo interno. Para o preparo do inóculo, as células provenientes dos erlenmeyers (cultivo de ativação) foram multiplicadas em reatores tubulares (provetas) de 250 mL, e em seguida cultivadas nos PBR_1 com volume de 1 L até atingir o final do crescimento exponencial. As condições de operação foram similares àquelas utilizadas no cultivo em PBR. A quantidade de inóculo utilizada foi suficiente para garantir uma concentração inicial de biomassa nos PBR_2 entre 0,5 e 1 g L^{-1}.

O meio de cultivo utilizado foi o $M\text{-}8_{mod}$ 3 vezes concentrado para evitar limitação por falta de nutrientes. O pH foi mantido entre 7 e 8 pela adição de 3 g L^{-1} de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), que atuou como tampão. A temperatura foi mantida entre 30 e 35 °C, a depender da posição da lâmpada de vapor metálico, cujas intensidades luminosas variaram de 170 a 350 μmol m^{-2} s^{-1}. A vazão de entrada de ar variou de 1 a 4 L L^{-1} min^{-1}, com 10 % de CO_2. O antiespuma a base de silicone SE-15 (Sigma-Aldrich) foi utilizado. A concentração de biomassa foi medida diariamente pelo método espectrométrico.

Após o estudo das configurações do PBR, aquela caracterizada como mais favorável ao crescimento das células de microalgas foi adotada para a realização dos experimentos subsequentes.

4.4.2 Segundo nível hierárquico – Estudo da microalga

Esse nível foi fundamental para entender o comportamento da cepa utilizada perante as condições operacionais impostas pelo sistema de cultivo. Nessa etapa o foco foi dado à célula em si, estudando o seu metabolismo, tolerância às condições do meio de cultivo, de iluminação, de suplemento de CO_2, entre outros.

4.4.2.1 Avaliação da tolerância da cepa frente às diferentes condições do sistema

Nesta etapa a tolerância da cepa foi estudada com relação à diversos parâmetros ajustáveis do sistema, como segue: temperatura, pH, concentração de CO_2 na corrente de ar de entrada, concentração de nutrientes, intensidade luminosa e capacidade da cepa de metabolizar carbono orgânico. Para tanto, um cultivo fotoautotrófico e outro mixotrófico foram realizados nos PBR_2 em regime batelada alimentada com volume útil de 9 L. Os inóculos foram produzidos conforme descrito no tópico 4.4.1.3 e adicionados ao meio em quantidade suficiente para fornecer uma concentração inicial entre 0,5 e 1 g L^{-1}.

O meio de cultivo utilizado foi o M-8_{mod} 3 vezes concentrado para evitar a limitação do crescimento pela escassez de nutrientes. A vazão de entrada de gás (ar + CO_2) inicial foi de 1 L L^{-1} min^{-1}, sendo aumentada gradualmente até 4 L L^{-1} min^{-1} em função do aumento da biomassa. A concentração de CO_2 na corrente de entrada de ar variou de 5 a 15 %. A intensidade luminosa incidente em um dos lados dos PBR_2 foi mantida em 300 μmol m^{-2} s^{-1} com lâmpadas fluorescentes (ver Tabela 4.2). Já no outro lado a intensidade variou entre 100 e 1000 μmol m^{-2} s^{-1}, de acordo com a proximidade da lâmpada de vapor metálico. A temperatura do sistema foi controlada pela posição da lâmpada de vapor metálico instalada em frente ao módulo operacional, sendo mantida entre 23 e 36 °C. O pH do meio foi mantido entre 7 e 8 com a utilização do $NaHCO_3$ (bicarbonato de sódio) como tampão.

Ao cultivo mixotrófico foi adicionado etanol como fonte de carbono orgânico. Para evitar a inibição do crescimento, 8 g L^{-1} de etanol foram inseridos após a concentração da biomassa atingir um valor relativamente alto (cerca de 5 g L^{-1}). Após as células se mostrarem adaptadas às novas condições a concentração de etanol foi gradativamente aumentada até se observar inibição do crescimento, de acordo com o decaimento da concentração de biomassa.

Para validar as hipóteses obtidas pela avaliação do experimento anterior, outro cultivo foi realizado em PBR_2 utilizando-se as condições que se mostraram favoráveis ao crescimento.

4.4.2.2 Otimização do meio de cultivo

O procedimento de otimização do meio de cultivo foi realizado com base na composição elementar da biomassa microalgal, determinada conforme descrito no tópico 4.3.2. A definição do composto químico utilizado para fornecer cada nutriente (macro e micro) foi realizada com base nos meios M-8, proposto por Mandalam e Palsson (1998), e BG-11, proposto por Stanier e colaboradores (1971). A Tabela 4.6 apresenta as fontes de nutrientes para cada elemento encontrado na biomassa, de acordo com os meios M-8 e BG-11.

Tabela 4.6 – Fontes de nutrientes dos meios M-8 e BG-11

Elemento	M-8	BG-11
N	KNO_3; FeEDTA	$NaNO_3$; Citrato de amônio e ferro (III) – $C_6H_{11}FeNO_7$; Na_2EDTA
P	KH_2PO_4; Na_2HPO_4	K_2HPO_4
Mg	$MgSO_4.7H_2O$	$MgSO_4$
Na	Na_2HPO_4	$Na_2EDTA.2H_2O$; Na_2CO_3; $Na_2MoO_4.2H_2O$
K	KH_2PO_4; KNO_3	K_2HPO_4
Ca	$CaCl_2.2H_2O$	$CaCl_2.2H_2O$
Fe	FeEDTA; $FeSO_4.7H_2O$	Citrato de amônio e ferro (III) – $C_6H_{11}FeNO_7$
Mn	$MnCl_2.4H_2O$	$MnCl_2.4H_2O$
Mo	–	$Na_2MoO_4.2H_2O$
Zn	$ZnSO_4.7H_2O$	$ZnSO_4.7H_2O$
Cu	$CuSO_4.5H_2O$	$CuSO_4.5H_2O$
B	–	H_3BO_3
Ni	–	–
Adicionais	–	Ácido cítrico.H_2O

A composição mínima para garantir o crescimento de 1 g de biomassa foi obtida por meio da programação matemática linear. Para tanto, foi construída uma função objetivo (FO) visando a minimização da quantidade de cada composto presente no meio. Essa FO foi sujeita à algumas restrições, que se constituíram de inequações baseadas na composição

elementar da biomassa. O método de otimização utilizado foi o simplex, sendo o sistema de equações gerado resolvido pelo método de eliminação de Gauss, implementados no *software* Maple®.

Caracteriza-se pela função objetivo linear (Equação 4.5) e restrições lineares (Equação 4.6), cujas variáveis de decisão apresentam a condição de não negatividade. É um tipo de modelo convexo, na qual a função objetivo é convexa e as restrições formam um conjunto convexo e, portanto, o ótimo local é também global.

$$\boldsymbol{Min}\ f(x) = c_1x_1 + c_2x_2 + \cdots + c_nx_n = \sum_{i=1}^{n} c_ix_i \tag{4.5}$$

$$\begin{aligned} \boldsymbol{sujeito\ a}\ & a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \cdots + a_{1n}x_n \leq b_1 \\ & a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \cdots + a_{2n}x_n \leq b_2 \\ & a_{m1}x_1 + a_{m2}x_2 + \cdots + a_{mn}x_n \leq b_m \\ & x_i \geq 0 \end{aligned} \tag{4.6}$$

4.4.2.3 Influência da composição do meio de cultivo sobre o crescimento e a composição centesimal das células

Os cultivos para a avaliação da composição do meio sobre a concentração de biomassa e o teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos foram realizados em reatores tubulares com volume de 250 mL. Foram avaliados os meios M-8 e BG-11 originais e otimizados, preparados para produzir 10 g L^{-1} de biomassa. A vazão de gás (ar + CO_2) injetada foi de 1 a 2 L L^{-1} min^{-1} com 5 a 6 % de CO_2. A intensidade luminosa foi mantida de 56 a 70 μmol m^{-2} s^{1} com lâmpadas fluorescentes (câmaras A3 e A4). Após atingir o estado estacionário, parte da biomassa foi centrifugada e congelada para a determinação de pigmentos, e parte foi centrifugada a 3000 rpm por 3 min, seca em estufa a 40 °C e armazenada em refrigerador para posterior determinação de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos.

4.4.2.4 Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento e a composição centesimal das células

O meio que proporcionou o melhor resultado de crescimento celular foi avaliado com diferentes fontes de nitrogênio, sendo estudadas 3 fontes inorgânicas (nitrato de amônio – NH_4NO_3, nitrato de sódio – $NaNO_3$ e nitrato de potássio – KNO_3) e 1 orgânica (ureia – $(NH_2)_2CO$). As condições de cultivo foram as mesmas aplicadas ao experimento de avaliação dos diferentes meios.

Tanto para os ensaios com meios originais e otimizados quanto para aqueles com diversas fontes de nitrogênio, os resultados foram avaliados a partir da análise de variância (ANOVA) para um único fator após verificação da homogeneidade das variâncias conforme os testes Estatística χ^2 de Bartlett, Estatística de Cochran, Estatística de Hartley e Testes de normalidade das observações: Teste de Kolmogorov-Smirnov, Teste de Lilliefors e Teste de Shapiro-Wilk. Após a ANOVA, os testes de Fisher MDS, Tukey DHS e Duncan foram aplicados para avaliar quais pares de médias são estatisticamente diferentes entre si.

4.4.3 Terceiro nível hierárquico – Modelagem da cinética de crescimento de microalgas em PBR

A modelagem matemática da cinética de crescimento em sistema descontínuo (Figura 4.8) foi realizada admitindo-se a modelagem fenomenológica de modelos não estruturados e não segregados. Neste estudo foram consideradas como variáveis o $[H^+]$, $[CO_2]$, $[HCO_3^-]$, $[CO_3^{2-}]$, [CIT], OD, X, I_{av}, T, yCO_2 e yO_2.

O balanço de massa para a biomassa (X) foi realizado para incorporar os modelos cinéticos ao modelo complexo do PBR. Adicionalmente, para avaliar a influência do pH em μ como função das espécies de carbono inorgânico presentes no meio, os balanços de massa foram realizados para o CO_2, HCO_3^- e CO_3^{2-} com base nas reações de especiação do CO_2 em água (Equações 2.4 a 2.6). Finalmente, o balanço de eletro neutralidade foi realizado e combinado com o conhecimento da dinâmica de equilíbrio do CO_2 em água para se obter o balanço do pH.

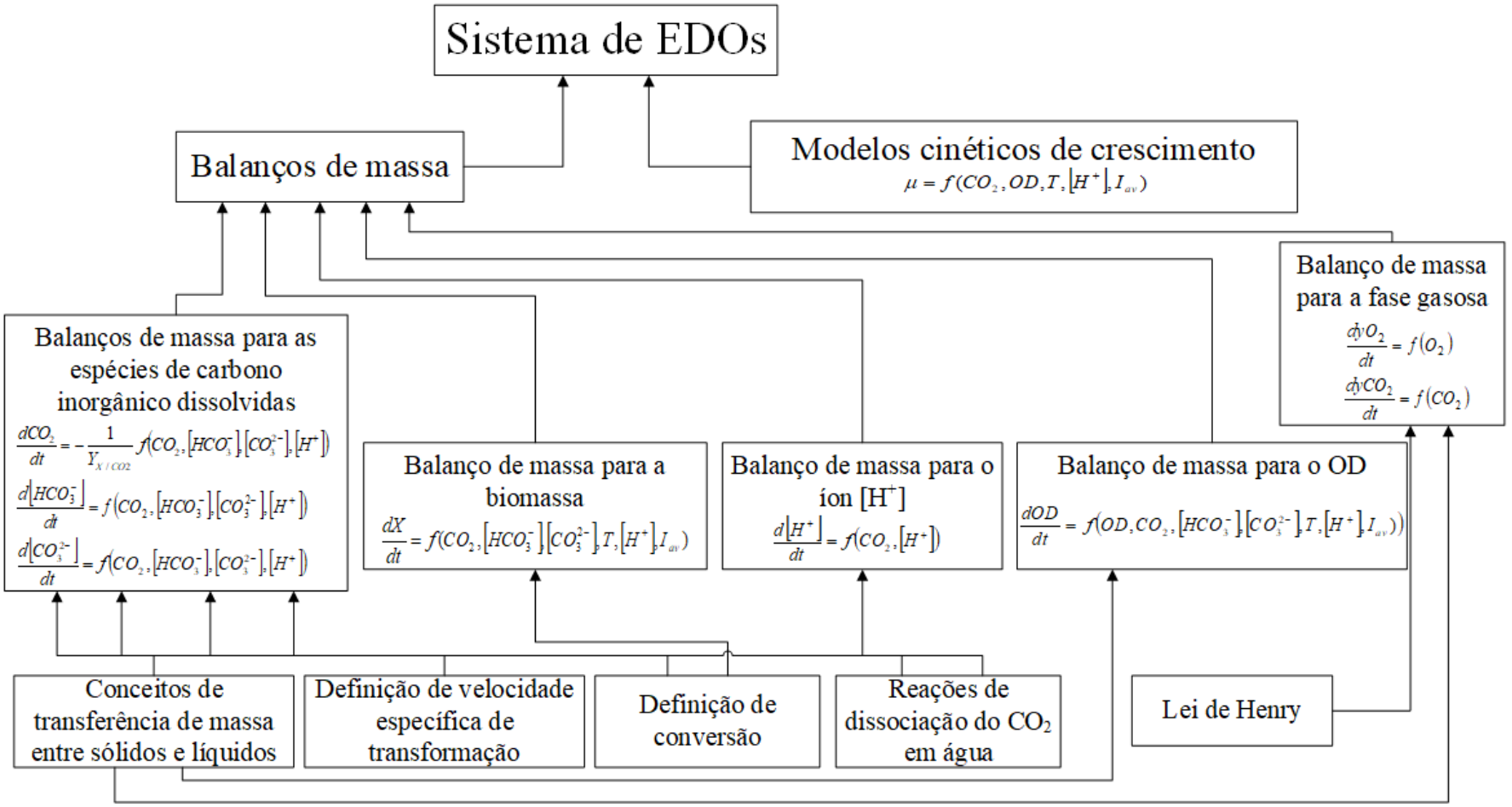

Figura 4.8 – Fluxograma do sistema de equações do modelo proposto para descrever os dados experimentais do cultivo de microalgas

4.4.3.1 Escolha dos modelos cinéticos de crescimento algal

Os modelos cinéticos utilizados para representar as relações de limitação e/ou inibição pelas variáveis estudadas sobre o crescimento celular foram obtidos da literatura, com base nas características do processo e nas considerações dos modelos propostos. Os modelos escolhidos para descrever o sistema estudado estão apresentados na Tabela 4.7, sendo a intensidade luminosa média incidente no PBR calculada a partir da Equação 4.7, que representa a dependência de I_{av} em função da concentração da biomassa (Li *et al*., 2003).

$$I_{av} = \frac{I_0 E_0 \left(1 - e^{-E_1 X^n}\right)}{X^n} \tag{4.7}$$

Tabela 4.7 – Modelos cinéticos que representam os efeitos das variáveis controláveis do sistema

Modelo	Referência
$\mu_T = \frac{(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})\left((T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)\right)}$	Rosso *et al*. (1995)
$\mu_{pH} = \frac{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max}) - \left(pH - pH_{opt}\right)^2}$	Rosso *et al*. (1995)
$\mu_{CIT} = \mu_{max} \frac{CIT}{(K_{sCIT} + CIT)}$	Monod (1942)
$\mu_{O_2} = \mu_{max} \frac{K_{iO2}}{(K_{iO2} + OD)} \frac{OD}{K_{sO2} + OD}$	Nauha e Alopaeus (2013) Monod (1949)
$\mu_{I_{av}} = \mu_{max} \frac{I_{av}\left(1 - \frac{I_{av}}{I_{mm}}\right)}{\mathrm{K}_{sIav} + I_{av}}$	Li *et al*. (2003)

4.4.3.2 Balanços de massa em sistema descontínuo

As equações obtidas a partir da modelagem fenomenológica de modelos não estruturados e não segregados foram correlacionadas com as equações dos modelos cinéticos escolhidos (Tabela 4.7). Para tanto, foram consideradas as reações de dissociação do CO_2 e SO_2 em água, as definições de conversão, de velocidade específica de transformação e de transferência de massa entre líquidos e gases e a lei de Henry, conforme apresentado na Figura 4.8. Como resultado gerou-se para cada conjunto de modelos avaliados, um sistema

de EDOs vinculando os parâmetros estequiométricos do processo aos parâmetros dos modelos cinéticos.

4.4.4 Quarto nível hierárquico – Modelo simplificado

No quarto nível do estudo, foi proposto um modelo complexo capaz de descrever e prever o comportamento do processo de cultivo de microalgas em fotobiorreator de placas planas.

4.4.4.1 Modelo simplificado do sistema

O modelo simplificado proposto para descrever o processo de cultivo de microalgas em PBR de placas planas foi construído a partir das equações de balanço de massa obtidas no terceiro nível hierárquico, juntamente com as equações de transferência de massa obtidas no primeiro nível hierárquico. As informações obtidas no segundo nível hierárquico foram utilizadas no processo de obtenção dos dados experimentais para o procedimento de estimação dos parâmetros.

4.4.4.2 Dados experimentais para o procedimento de estimação dos parâmetros

Um cultivo em regime batelada foi realizado no PBR_2 em sistema fechado, conforme apresentado na Figura 4.9. Durante este experimento as variáveis pH, T, CO_2, OD e intensidade luminosa na parede do reator foram monitoradas em amostras retiradas a cada 24 h.

O procedimento para início do cultivo foi realizado como segue: enquanto o ar e CO_2 foram bombeados para o reservatório (E) as correntes (C) e (D) ficaram fechadas, e as correntes (A) e (B) ficaram abertas. A concentração do CO_2 dentro do reservatório foi determinada pela razão entre a vazão das correntes (A.1) e (A.2). A concentração de CO_2 na corrente de saída (B) foi medida até apresentar-se constante e no valor desejado. As correntes (A) e (B) foram então fechadas, as correntes (C) e (D) foram abertas e a bomba (G) foi ligada. O inóculo foi adicionado após iniciada a circulação do ar, caracterizando-se como o ponto inicial do cultivo.

O inóculo foi a cultura proveniente dos reatores tubulares, retirados na fase de crescimento exponencial, em quantidade suficiente para se obter uma concentração celular inicial entre 0,5 e 1,0 g L^{-1}. O meio utilizado foi o M-8*. As condições de pH, T, CO_2, O_2 e intensidade luminosa foram determinadas com base nos resultados obtidos pelo estudo dos subsistemas I.I e I.II.

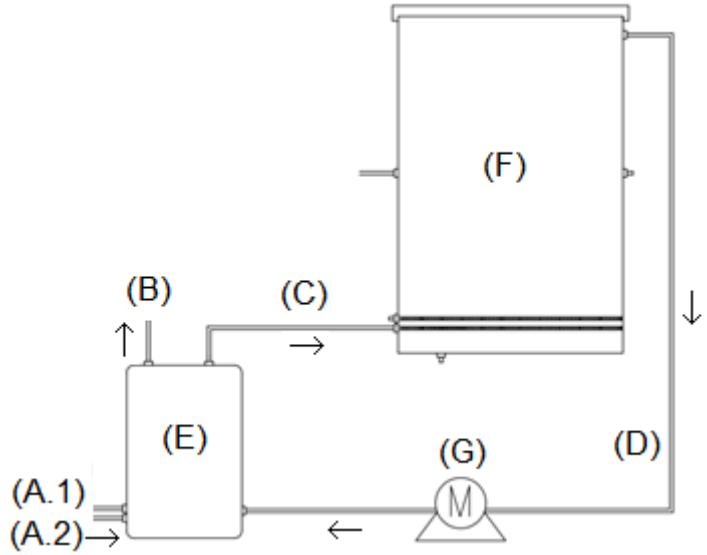

Figura 4.9 – Esquema do cultivo fechado de microalgas: (A.1) corrente de entrada de ar; (A.2) corrente de entrada de CO_2, (B) corrente de saída do gás, (C) e (D) linhas de gás; (E) reservatório do gás; (F) PBR_2 e (G) bomba de circulação do gás. As setas indicam o sentido do fluxo de gás.

4.4.4.3 Estimação de parâmetros

Os parâmetros dos modelos foram estimados por um método de otimização baseado em Algoritmo Genético (HOLLAND, 1975) implementado no *software* Maple®. O sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs) ligadas aos modelos cinéticos foi resolvido pelo método numérico do pacote lsode[backfull]. A função dos mínimos quadrados (Equação 4.8) foi utilizada como critério de minimização, admitindo-se distribuição normal das variações experimentais e erros constantes em todas as condições experimentais.

$$FObj = \sum_{i=1}^{NV}\sum_{j=1}^{NP}\left(\frac{\tilde{y}_{ij} - y_{ij}}{y_i^{max}}\right)^2 \qquad (4.8)$$

Sendo y_{ij} valor experimental da variável *i* em *j-ésimo* ponto experimental; $\tilde{y}_{ij}$ valor calculado da variável *i* em *j-ésimo* ponto do modelo; e y_i^{max} maior valor experimental da variável *i*.

Todas as execuções foram realizadas em microcomputador Intel Core i5 (2,5 GHz e 3 MB de memória cache), com 6 GB de memória RAM.

4.4.4.4 Algoritmo genético

Um algoritmo baseado nos Algoritmos Genéticos (AG) (HOLLAND, 1975) foi implementado no *software* Maple®, de acordo com a Figura 4.10. Uma descrição detalhada do método e de suas aplicações foi apresentada por Hinterholz (2014). Inicialmente, foi gerada a matriz da população inicial de forma randômica, considerando o intervalo de busca fornecido para cada parâmetro. Cada indivíduo consistiu em um vetor com o número de posições iguais ao número de parâmetros do modelo, caracterizando uma possível solução para o problema. Na próxima etapa, cada indivíduo foi avaliado junto ao modelo cinético (Tabela 4.7) acoplado ao sistema de EDOs, gerando um valor de aptidão (aptidão=f(função objetivo)).

A partir daí alguns indivíduos foram selecionados pelo método do torneio com uma taxa de 30%, gerando a população de pais. Os pais foram então cruzados pelo método do ponto único a uma taxa de 50%, gerando uma nova população de indivíduos, chamados de filhos. A fim de se evitar a obtenção de um ótimo local, a população de filhos passou por uma etapa de mutação pelo método do ponto aleatório, a uma taxa de 30%.

Ao final de cada iteração foi obtida uma nova população, constituída pelos pais selecionados e filhos gerados (cruzamento e mutação). Essa nova população teve sua aptidão avaliada, obtendo-se a função objetivo para cada conjunto de possíveis soluções.

Ao final das iterações (de número pré-estabelecido) o indivíduo que apresentou a maior aptidão foi considerado como o conjunto de parâmetros que melhor descreve o sistema de equações avaliado.

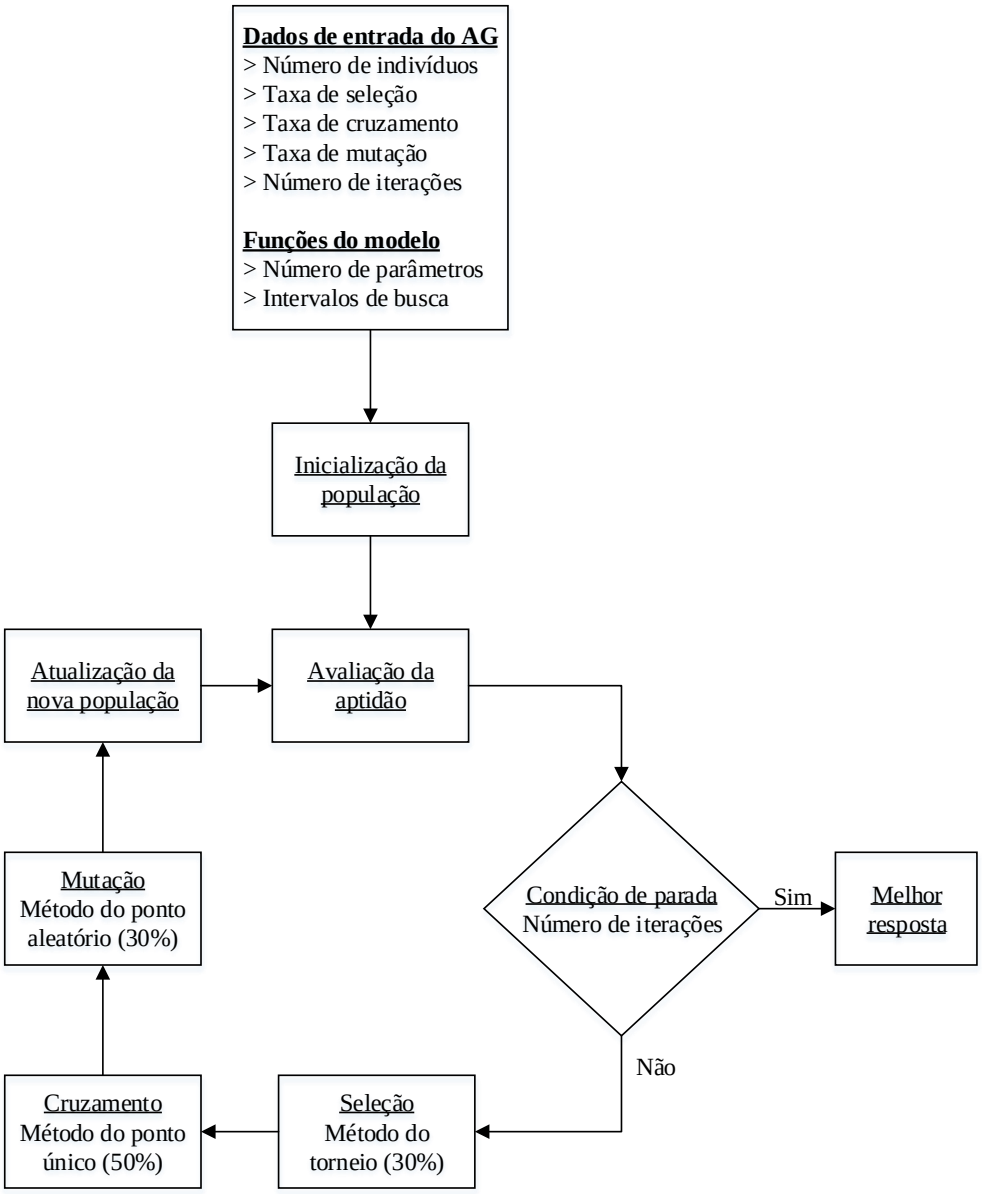

Figura 4.10 – Esquema do algoritmo implementado para a busca de parâmetros dos modelos

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 - Resultados e Discussão

5.1 Coleta e isolamento da cepa de microalga

Amostras de água continental foram coletadas de lagos artificiais. Pela avaliação em microscópio foi verificada a presença de células de microalgas de diversas espécies. Após o procedimento de isolamento, foi verificado que todas as células suspensas apresentaram os mesmos aspectos morfológicos (Figura 5.1).

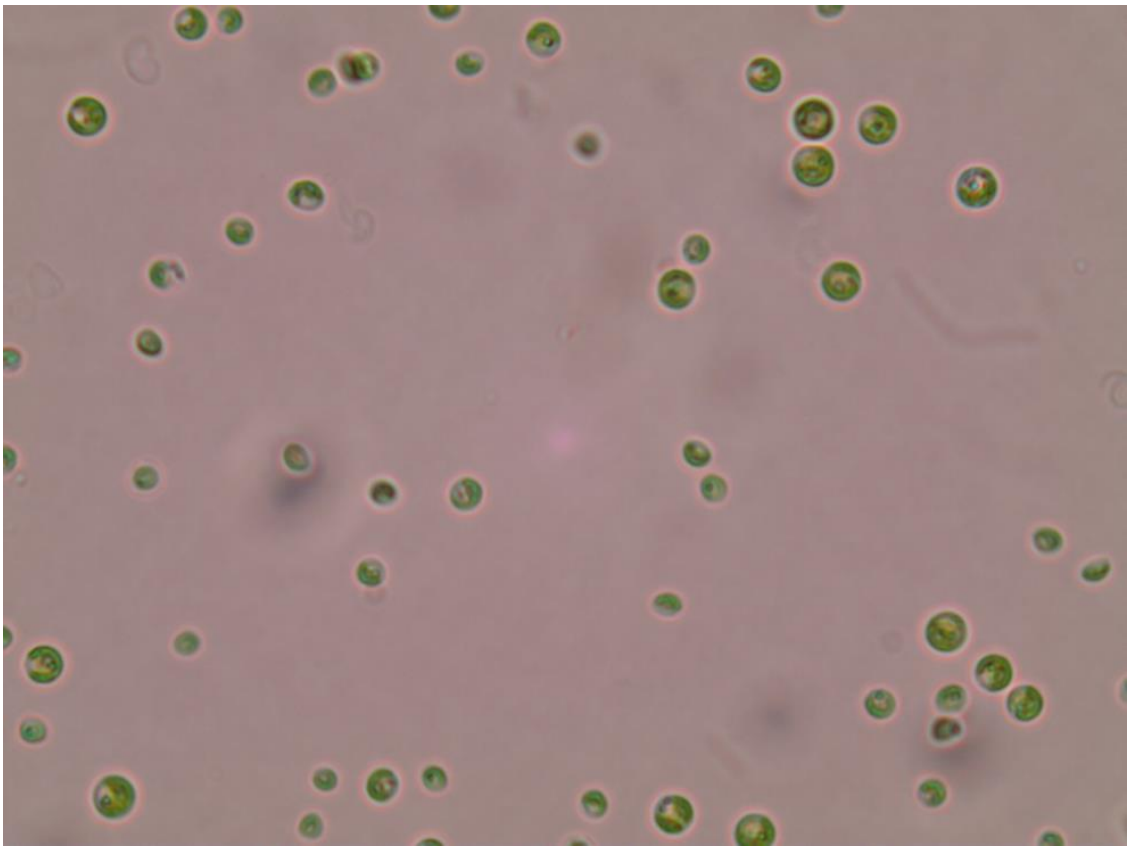

Figura 5.1 – Células presentes na amostra após o procedimento de isolamento

Após o isolamento, a identificação da espécie foi realizada pelo grupo de pesquisa a partir do sequenciamento da região genômica do rDNA 18S amplificada. Pelo alinhamento da sequência obtida com bases de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*), juntamente com análises morfológicas e levando-se em consideração informações da literatura, foi determinado que as células isoladas são da espécie *Poterioochromonas malhamensis.*

5.2 Estudo do processo de cultivo

A TGS foi aplicada ao processo de cultivo de microalgas em PBR, resultando em quatro níveis hierárquicos, sendo o primeiro relacionado ao estudo do PBR desenvolvido, levando-se em consideração suas características de hidrodinâmica e transferência de massa. O segundo nível hierárquico compreendeu o estudo da cepa isolada, considerando-se as variáveis ajustáveis do processo e a otimização do meio de cultivo de acordo com a composição elementar das células. No terceiro nível hierárquico foi realizada a modelagem matemática da cinética de crescimento de microalgas em PBRs fechados. A combinação do conhecimento obtido nos três primeiros níveis foi realizada no quarto nível hierárquico, sendo estimados os parâmetros cinéticos e estequiométricos do processo.

5.2.1 Primeiro nível hierárquico – Estudo do PBR

5.2.1.1 Modelos teóricos da cinética de transferência de massa

Aplicando-se a teoria dos dois filmes estagnados, foram realizados os balanços de massa apresentados nas Equações 5.1 e 5.2 para representar a variação na concentração na fase líquida de CO_2 e O_2, respectivamente, devido à transferência de massa entre as fases. Da mesma forma, foram obtidas as Equações 5.3 e 5.4 para a variação na concentração das mesmas espécies na fase gasosa.

$$\frac{dCO_2}{dt} = K_L a_{CO_2}\left(CO_2^{eq} - CO_2\right) \tag{5.1}$$

$$\frac{dOD}{dt} = K_L a_{O_2}\left(O_2^{eq} - OD\right) \tag{5.2}$$

$$\frac{dyCO_2}{dt} = -K_L a_{CO_2}\left(CO_2^{eq} - CO_2\right) \tag{5.3}$$

$$\frac{dyO_2}{dt} = -K_L a_{O_2}\left(O_2^{eq} - OD\right) \tag{5.4}$$

5.2.1.2 Estudo da transferência de massa – planejamento experimental

Os resultados obtidos nos 28 experimentos do planejamento PFF, média e erro padrão para as variáveis de resposta utilizando-se o PBR_C (ver Figura 4.4) são apresentados na Tabela 5.1. As variáveis de resposta foram o $K_L a_{O_2}$, $K_L a_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq}, sendo os coeficientes de transferência de massa calculados a partir do ajuste das Equações 2.35 e 2.36 aos dados cinéticos de concentração obtidos em função do tempo, cujos coeficientes de correlação ficaram acima de 0,9. As concentrações de equilíbrio foram obtidas diretamente dos sensores. De acordo com a Tabela 5.1, os coeficientes $K_L a_{O_2}$ e $K_L a_{CO_2}$ variaram de 14,88 a 79,32 h^{-1} e de 0 a 125,40 h^{-1}, respectivamente. As concentrações de O_2 e CO_2 dissolvidos no equilíbrio variaram de 37,33 a 99,66% e de 0 a 98,33% relativo às concentrações de equilíbrio de O_2 e CO_2 dissolvidos em água pura, respectivamente.

Resultados similares foram obtidos para o $K_L a_{CO_2}$ por Guo e colaboradores (2015), que encontraram valores entre 18 e 90 h^{-1} em um PBR retangular com arraste de bolhas. Em 2003, Ebrahimi e colaboradores utilizaram o valor de 91,73 h^{-1} para este mesmo parâmetro, considerando um gás com cerca de 14% de CO_2 em um reator do tipo coluna de bolhas.

Com relação ao $K_L a_{O_2}$, Kochem e colaboradores (2014), encontraram valores de até 36 h^{-1} em um fotobiorreator de placas planas com área da seção transversal de $8{,}6.10^{-3}$ m^2 e velocidade superficial do gás de até $1{,}5.10^{-2}$ m s^{-1}. Os valores encontrados no presente estudo foram significativamente maiores, mesmo com a área da seção transversal maior (2.10^{-2} m^2). Isto pode ser explicado pela alta velocidade de entrada do gás utilizada, que foi de até 0,025 m s^{-1}. Outro fator que pode contribuir para o aumento na taxa de transferência de massa é a presença do módulo interno de dispersão de bolhas perfurado, que pode diminuir o diâmetro médio das bolhas, aumentando a área superficial entre o gás e o líquido. Sánchez Mirón e colaboradores (2000) encontraram valores de $K_L a_{O_2}$ de até 100 h^{-1} em um reator de coluna de bolhas com área da seção transversal de aproximadamente 0,03 m^2, utilizando um dispersor de bolhas na entrada do gás. Em outro trabalho com PBR em coluna com área da seção transversal de 0,16 m^2, Choi e colaboradores (1996), encontraram valores de $K_L a_{O_2}$ de até 250 h^{-1} com altas velocidades de entrada de gás (até 0,08 m s^{-1}).

Tabela 5.1 – Condições e respostas experimentais do planejamento PFF

Condição Experimental				Resposta			
Q_{gas} (L L^{-1} min^{-1})	ϕ_{CO2} (%)	C_{AE} (mL L^{-1})	ϕ_{Sal} (%)	$K_L a_{O_2}$ (h-1)	$K_L a_{CO_2}$ (h-1)	O_2^{eq} (%)	CO_2^{eq} (%)
2	60	0	0	79,08±2,72	104,04±6,68	57,33±1,24	83,33±0,47
2	0	0,1	50	33,36±0,90	0,00±0,00	94,00±0,81	0,00±0,00
2	0	0	100	39,36±1,62	0,00±0,00	99,00±0,81	0,00±0,00
2	60	0,1	100	36,31±5,41	28,92±2,46	44,00±2,16	90,33±0,47
2	60	0,2	50	32,16±1,36	47,52±3,82	42,33±0,94	90,33±0,47
1	0	0,2	50	15,12±0,59	0,00±0,00	92,33±0,47	0,00±0,00
3	0	0	50	39,96±1,18	0,00±0,00	98,33±0,47	0,00±0,00
1	60	0	50	27,96±0,45	37,68±3,53	42,00±0,00	98,33±0,47
3	0	0,1	0	38,16±0,59	0,00±0,00	91,33±0,47	0,00±0,00
3	60	0,2	0	43,44±8,22	80,40±3,14	37,33±0,94	91,00±0,81
1	60	0,1	0	19,08±3,07	59,52±1,61	43,66±0,47	85,66±0,47
1	30	0,1	50	16,20±1,28	22,68±2,33	63,66±0,47	77,33±1,24
2	30	0	50	36,36±7,21	40,80±4,42	73,00±2,16	78,00±3,55
2	30	0,1	0	34,68±1,11	67,20±2,77	67,00±1,41	76,66±0,47
3	30	0,2	50	51,48±4,73	39,12±1,61	66,33±0,47	82,00±0,00
3	30	0,1	100	47,64±1,62	32,40±5,39	73,33±0,94	79,66±0,47
1	0	0	0	41,52±2,73	0,00±0,00	99,66±0,47	0,00±0,00
3	60	0,1	50	39,60±2,56	53,76±6,04	39,00±0,81	88,00±0,00
2	0	0,2	0	30,00±1,67	0,00±0,00	94,66±2,35	0,00±0,00
1	0	0,1	100	17,04±1,19	0,00±0,00	99,33±0,94	0,00±0,00
1	30	0,2	0	18,84±0,17	46,44±0,50	63,66±1,24	76,33±0,47
1	30	0	100	20,76±1,51	22,68±5,09	68,00±4,96	81,33±0,47
2	30	0,2	100	35,76±2,21	29,76±1,35	70,00±0,81	80,00±0,00
1	60	0,2	100	14,88±1,77	22,56±2,89	41,67±0,47	90,00±0,81
3	30	0	0	79,32±3,78	125,40±4,25	73,00±0,81	75,66±0,47
3	60	0	100	67,80±16,0	46,68±5,62	43,00±0,81	90,67±0,47
3	0	0	100	37,08±3,39	0,00±0,00	99,33±0,47	0,00±0,00
2	30	0,1	50	36,36±2,98	38,76±5,46	71,00±3,56	80,00±1,41

Valor médio com erro padrão

Utilizando-se os resultados obtidos experimentalmente, foram construídos os gráficos dos resíduos em função da sequência dos ensaios, que são apresentados na Figura 5.2. Analisando-se a Figura 5.2, foi possível descartar a hipótese de aumento do erro ao

longo do período de realização dos experimentos em função de problemas experimentais, como a perda da calibração dos sensores, por exemplo. Por outro lado, verificaram-se dois pontos discrepantes nas Figuras 5.2-A e D. Para garantir que estes pontos realmente representam erros experimentais, foram construídos os intervalos de confiança (média ± erro padrão) de 95% para todos os dados de $K_L a_{O_2}$ e CO_2^{eq}, conforme Tabela 5.2. Como ambos os valores apresentaram-se fora dos intervalos de confiança, eles foram desconsiderados nas análises estatísticas.

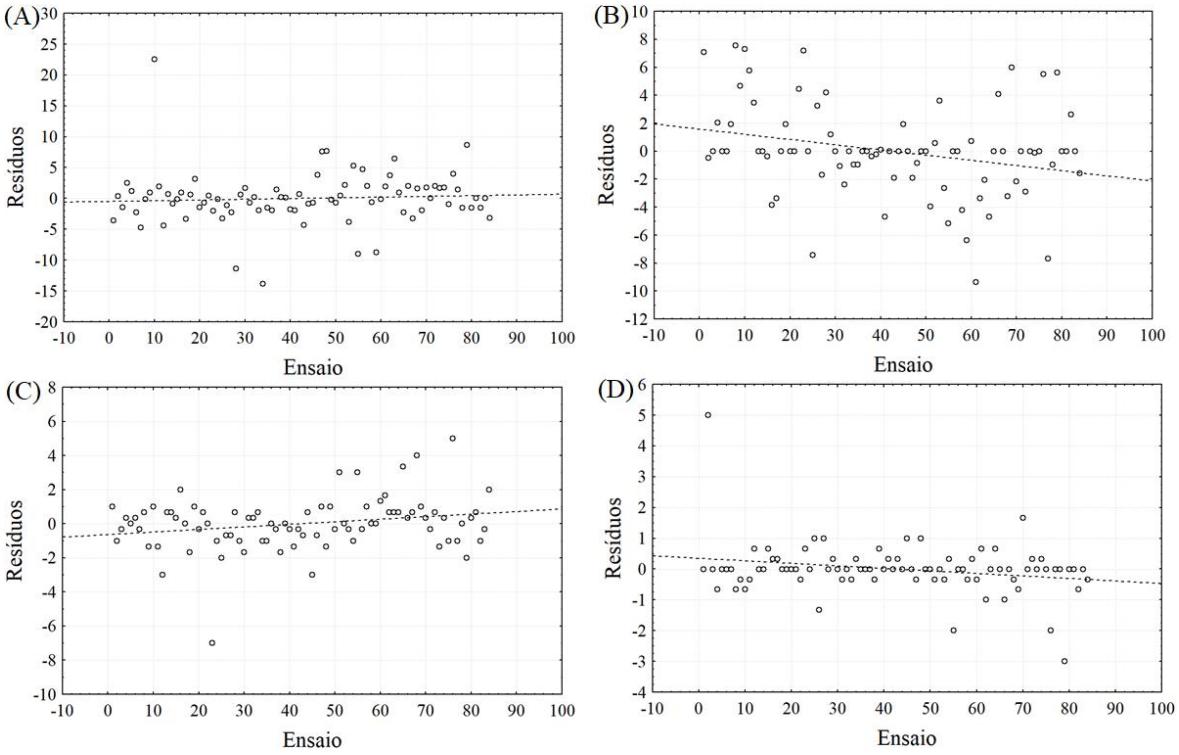

Figura 5.2 – Dispersão dos resíduos em função da sequência dos ensaios para as variáveis: (A) $K_L a_{O_2}$; (B) $K_L a_{CO_2}$; (C) O_2^{eq} e (D) CO_2^{eq}

Tabela 5.2 – Intervalos de confiança para as variáveis $K_L a_{O_2}$ e CO_2^{eq}

Variável	Unidade	Valor discrepante	Intervalo de confiança	
			Mínimo	Máximo
$K_L a_{O_2}$	h^{-1}	90,36	56,43	79,17
CO_2^{eq}	%	83,00	61,29	52,61

A Tabela 5.3 foi construída para avaliar a importância de se utilizar todos os efeitos para a construção dos modelos e análises estatísticas, ou se apenas os efeitos significativos descreveriam os dados de forma satisfatória. Os resultados apresentados apontam falta de

ajuste para todas as variáveis estudadas quando considerados apenas os efeitos significativos, o que não ocorreu nos casos em que todos os efeitos foram utilizados. Como a desconsideração dos efeitos não significativos gerou falta de ajuste, que mesmo que não significativa, apresentou p-valores consideravelmente próximos do nível de significância (<0,05), reduzindo o R^2 ajustado em todos os casos exceto para o CO_2^{eq}, que se manteve constante, todos os efeitos foram utilizados para a construção dos modelos e para as análises estatísticas.

Tabela 5.3 – Coeficiente de correlação e falta de ajuste dos modelos ajustados

Variável	Efeitos	R^2	R^2 ajustado	Falta de ajuste p-valor
$K_L a_{O_2}$	Todos	0,9635	0,9453	-
	Significativos	0,9565	0,9431	0,259875
$K_L a_{CO_2}$	Todos	0,9904	0,9856	-
	Significativos	0,9794	0,9731	0,000001
O_2^{eq}	Todos	0,9949	0,9924	-
	Significativos	0,9940	0,9920	0,222524
CO_2^{eq}	Todos	0,9998	0,9997	-
	Significativos	0,9979	0,9997	0,120815

Os gráficos das médias marginais para as variáveis estudadas $K_L a_{O_2}$, $K_L a_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq} são apresentados nas Figuras 5.3 a 5.6, respectivamente, considerando-se as combinações dos 4 fatores. Observando-se as Figuras 5.3 e 5.4, pode-se verificar que a interação entre todos os fatores estudados é importante e deve ser considerada. O mesmo não foi verificado nas Figuras 5.5 e 5.6, onde apenas as interações entre q_1 (vazão de entrada de gás, q_2 (concentração de CO_2 no gás de entrada) e q_3 (concentração de antiespuma) são claramente significativas. Estes mesmos comportamentos foram verificados nas superfícies de resposta para as variáveis resposta $K_L a_{O_2}$, $K_L a_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq}, apresentadas nas Figuras 5.14 a 5.17, respectivamente.

Este comportamento também pode ser visualizado nos gráficos de Pareto para as variáveis estudadas (Figura 5.7 a Figura 5.10), cujos números indicam os valores da estatística t. As figuras mostram que, embora os efeitos principais lineares foram consideravelmente mais significativos, diversas interações entre os efeitos também apresentaram importância estatística para o $K_L a_{O_2}$ e $K_L a_{CO_2}$

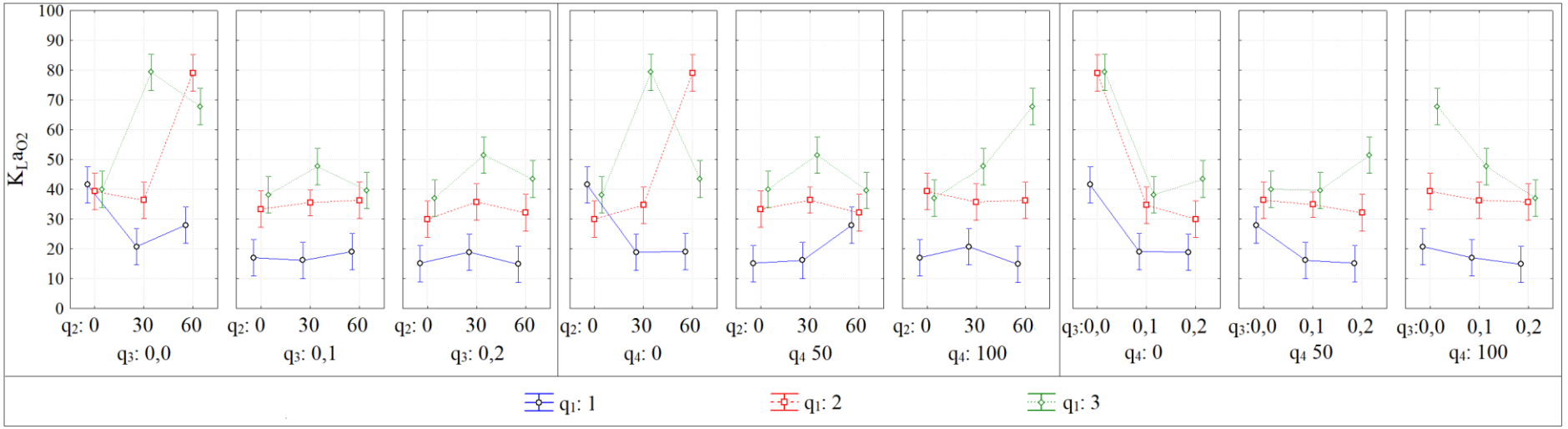

Figura 5.3 – Gráficos das médias marginais para o $K_L a_{O_2}$

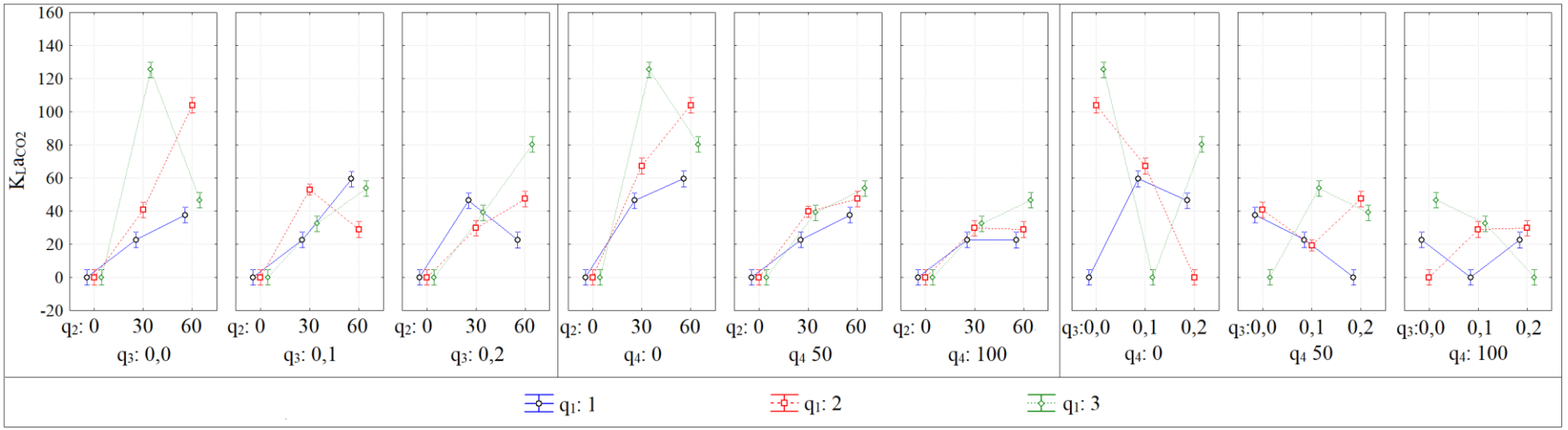

Figura 5.4 – Gráficos das médias marginais para o $K_L a_{CO_2}$

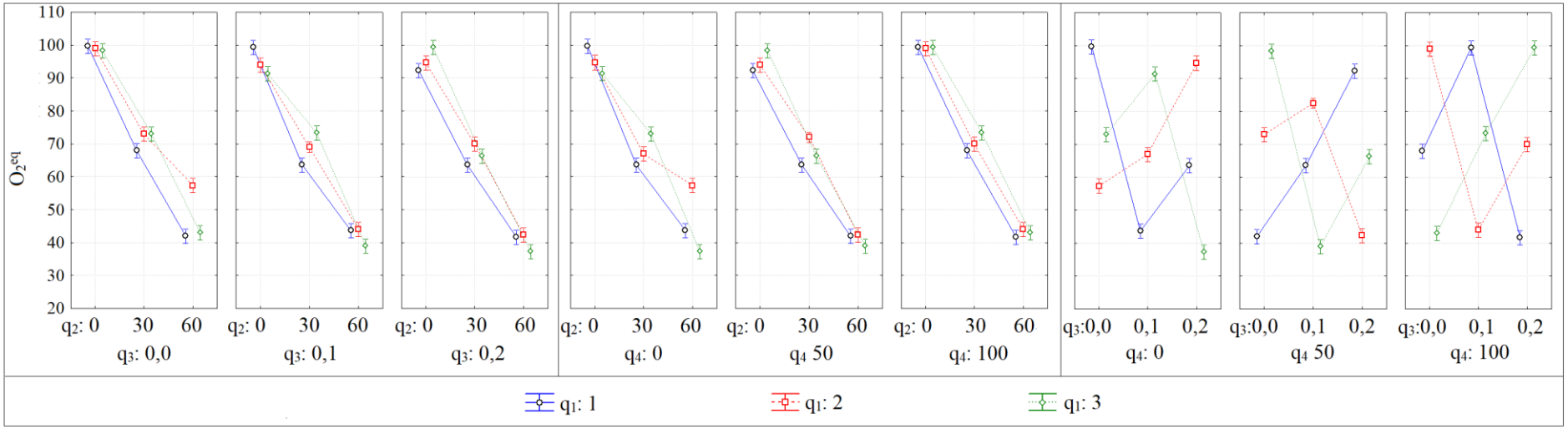

Figura 5.5 – Gráficos das médias marginais para o O_2^{eq}

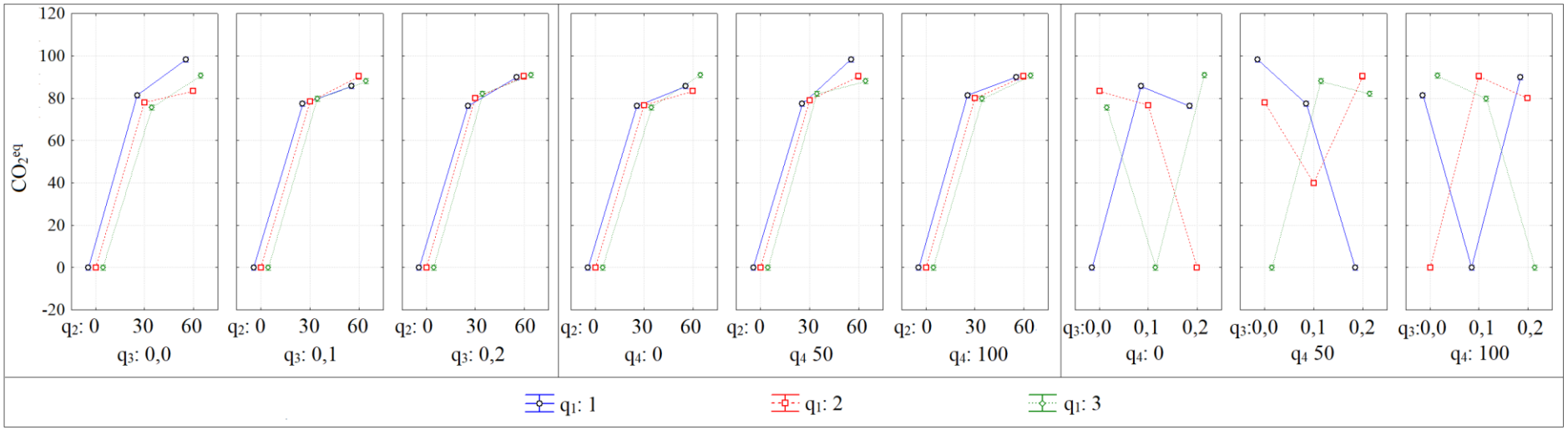

Figura 5.6 – Gráfico das médias marginais para o CO_2^{eq}

Analisando-se a Figura 5.7, verifica-se que para o $K_L a_{O_2}$ a influência mais significativa foi a do efeito linear da vazão de entrada de gás (q_1), indicando que quanto maior a vazão, maior a taxa de transferência de massa. Essa forte dependência da vazão é explicada a partir da área superficial de contato entre o gás e o líquido, que deve aumentar com o aumento da velocidade de injeção do gás, conforme apresentado por Chisti (1989). Além disso, Sánchez Mirón e colaboradores (2000) e Choi e colaboradores (1996) mostraram que o coeficiente volumétrico de transferência de massa aumenta com o aumento da velocidade do gás injetado e da vazão do fluxo gasoso, respectivamente. Assim, quanto maior a vazão de entrada, maior a agitação no meio e consequentemente, maior a transferência de massa.

Para a variável $K_L a_{CO_2}$, diferentemente do $K_L a_{O_2}$, a influência mais significativa foi a do termo linear da concentração do CO_2 (q_2), indicando que quanto maior a concentração de CO_2 na corrente de entrada, maior a taxa de transferência de massa (Figura 5.8). Embora não seja esperado que a composição do gás tenha influência significativa no coeficiente de transferência de massa, este resultado foi obtido pois o nível inferior do parâmetro q_2 (fração de CO_2 no gás de entrada) foi muito próximo de zero, sendo utilizado ar puro. Mesmo existindo uma pequena concentração de CO_2 no ar, essa quantidade não foi suficiente para ser detectada corretamente pelos sensores utilizados. Sendo assim, nos experimentos realizados no nível inferior deste parâmetro o $K_L a$ foi considerado nulo, o que levou ao resultado obtido.

O próximo fator em termos de significância sobre o $K_L a_{CO_2}$ foi o a salinidade do meio (q_4), que também apresentou influência sobre o $K_L a_{O_2}$, porém com menor intensidade. Por outro lado, enquanto a concentração de antiespuma (q_3) representou o fator com a segunda maior influência sobre o $K_L a_{O_2}$, seu efeito sobre o $K_L a_{CO_2}$ foi menor, embora estatisticamente significativo. O segundo efeito mais significativo foi o termo linear da concentração de antiespuma, indicando que quanto mais antiespuma, menor a taxa de transferência de massa.

A partir das Figuras 5.9 e 5.10, verifica-se que tanto para o O_2^{eq} quanto para o CO_2^{eq} o efeito principal da fração de CO_2 presente no gás (q_2) foi o mais significativo, considerando-se o termo linear para o O_2^{eq} e linear e quadrático para o CO_2^{eq}. O que difere os dois casos são os sinais dos efeitos, sendo negativo para o O_2^{eq} e positivo para o CO_2^{eq}, fato que pode ser claramente verificado a partir das tendências das médias marginais (Figura 5.5

e Figura 5.6). Este resultado era esperado pois quando a fração de CO_2 no gás de entrada aumenta, a fração de O_2 diminui, o que leva ao aumento (CO_2) e diminuição (O_2) das concentrações de equilíbrio das espécies, de acordo com a lei de Henry (Eq. 2.2).

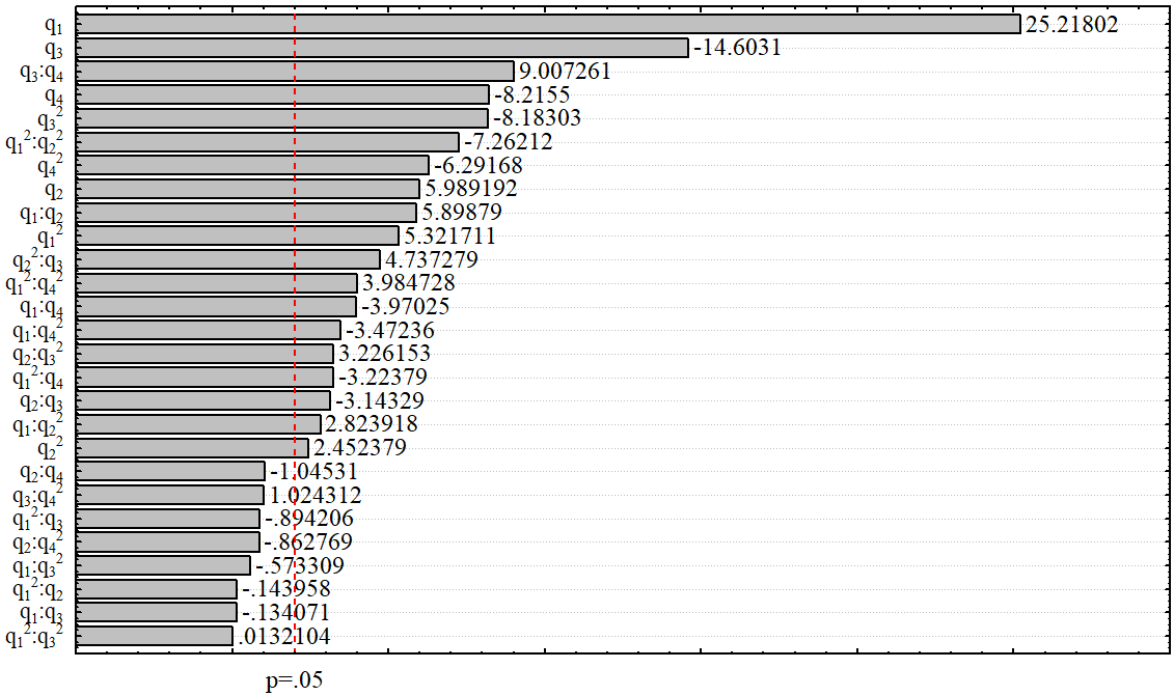

Figura 5.7 – Gráfico de Pareto representando os efeitos para o $K_L a_{O_2}$

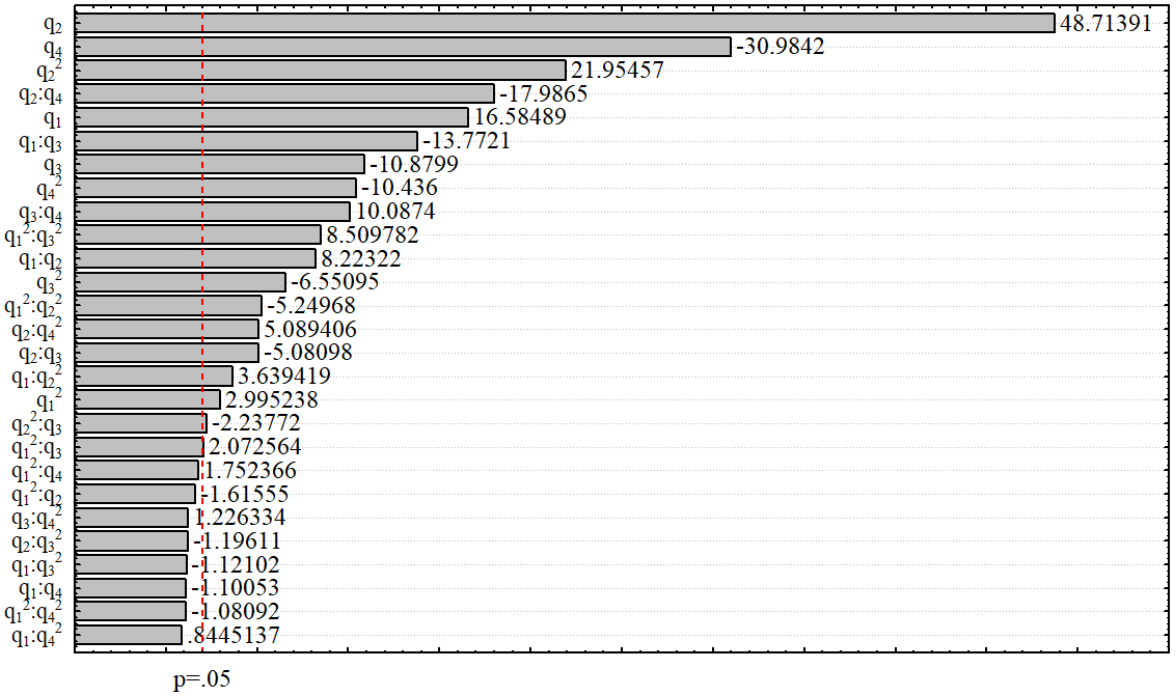

Figura 5.8 – Gráfico de Pareto representando os efeitos para o $K_L a_{CO_2}$

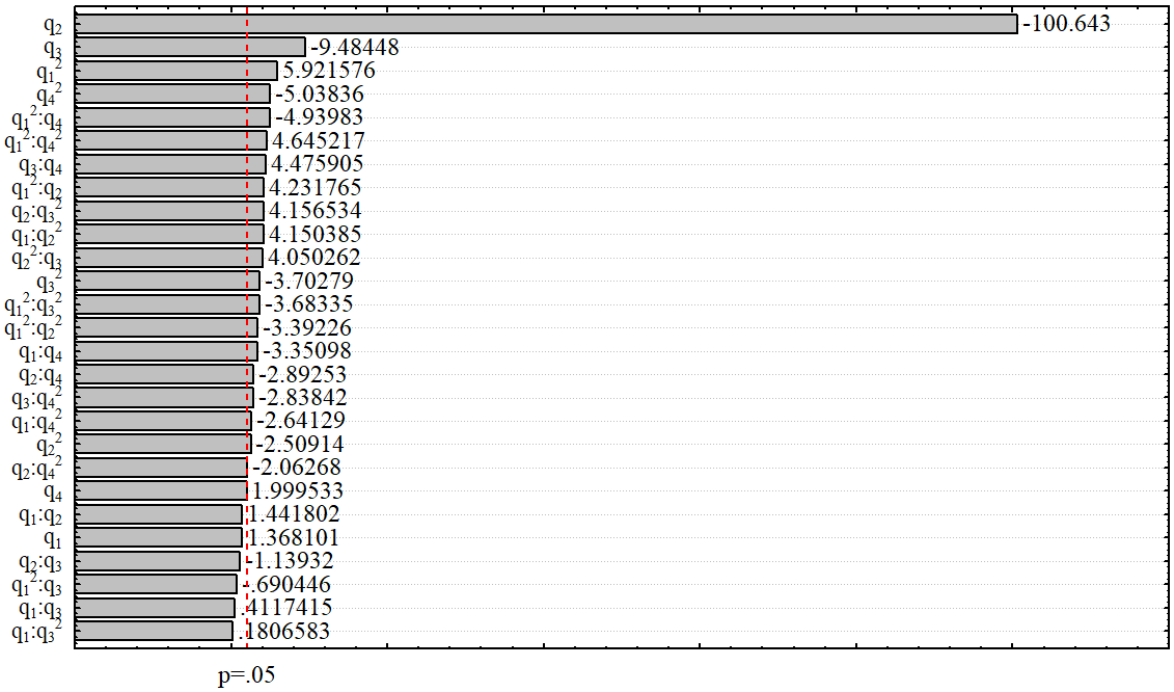

Figura 5.9 – Gráfico de Pareto representando os efeitos para o O_2^{eq}

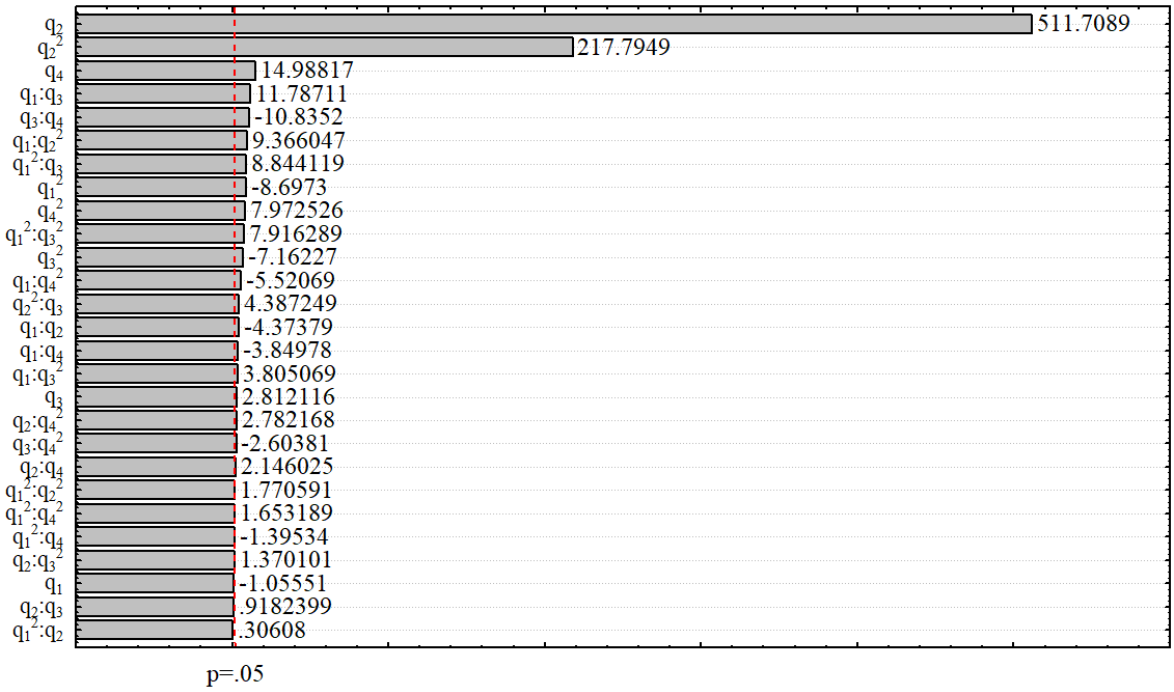

Figura 5.10 – Gráfico de Pareto representando os efeitos para o CO_2^{eq}

Os modelos que descrevem o comportamento das variáveis de resposta $K_L a_{O_2}$, $K_L a_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq} são apresentados nas Equações 5.5 a 5.8, respectivamente. Para a construção destas equações, foram consideradas as variáveis reais e todos os efeitos.

$$K_L a_{O_2} = 36{,}35 + 14{,}43q_1 + 2{,}48q_1^2 + 3{,}19q_2 + 1{,}14q_2^2 - 7{,}88q_3 - 3{,}76q_3^2 - 4{,}38q_4 - 2{,}93q_4^2 + 4{,}66q_1q_2 + 1{,}95q_1q_2^2 - 0{,}10q_1^2q_2 - 4{,}41q_1^2q_2^2 - 0{,}11q_1q_3 - 0{,}40q_1q_3^2 - 0{,}64q_1^2q_3 + 0{,}008q_1^2q_3^2 - 9{,}74q_1q_4 - 4.83q_1q_4^2 - 4.48q_1^2q_4 + 6.71q_1^2q_4^2 - 2{,}89q_2q_3 + 7{,}74q_2q_3^2 + 11.47q_2^2q_3 - 0{,}99q_2q_4 - 0{,}68q_2q_4^2 + 8{,}27q_3q_4 + 0{,}83q_3q_4^2 \quad (5.5)$$

$$K_L a_{CO_2} = 33{,}49 + 9{,}03q_1 + 1{,}42q_1^2 + 26{,}52q_2 + 10{,}44q_2^2 - 6{,}00q_3 - 3{,}07q_3^2 - 16{,}87q_4 - 4{,}96q_4^2 + 6{,}64q_1q_2 + 2{,}56q_1q_2^2 - 1{,}14q_1^2q_2 - 3{,}26q_1^2q_2^2 - 11{,}18q_1q_3 - 0{,}80q_1q_3^2 + 1{,}50q_1^2q_3 + 5{,}21q_1^2q_3^2 - 2{,}76q_1q_4 + 1{,}20q_1q_4^2 + 2{,}49q_1^2q_4 - 1{,}86q_1^2q_4^2 - 4{,}77q_2q_3 - 2{,}93q_2q_3^2 - 5{,}54q_2^2q_3 - 17{,}34q_2q_4 + 4{,}10q_2q_4^2 + 9{,}47q_3q_4 + 1{,}01q_3q_4^2 \quad (5.6)$$

$$O_2^{eq} = 69{,}49 + 0{,}36q_1 + 1{,}37q_1^2 - 26{,}56q_2 - 0{,}58q_2^2 - 2{,}54q_3 - 0{,}84q_3^2 + 0{,}53q_4 - 1{,}16q_4^2 + 0{,}56q_1q_2 + 1{,}42q_1q_2^2 + 1{,}44q_1^2q_2 - 1{,}02q_1^2q_2^2 + 0{,}16q_1q_3 + 0{,}06q_1q_3^2 - 0{,}24q_1^2q_3 - 1{,}09q_1^2q_3^2 - 4{,}07q_1q_4 - 1{,}82q_1q_4^2 - 3{,}40q_1^2q_4 + 3{,}87q_1^2q_4^2 - 0{,}52q_2q_3 + 4{,}94q_2q_3^2 + 4{,}86q_2^2q_3 - 1{,}35q_2q_4 - 0{,}81q_2q_4^2 + 2{,}04q_3q_4 - 1{,}14q_3q_4^2 \quad (5.7)$$

$$CO_2^{eq} = 56{,}02 - 0{,}09q_1 - 0{,}67q_1^2 + 44{,}89q_2 + 16{,}69q_2^2 + 0{,}25q_3 - 0{,}54q_3^2 + 1{,}31q_4 + 0{,}61q_4^2 - 0{,}57q_1q_2 + 1{,}06q_1q_2^2 + 0{,}03q_1^2q_2 + 0{,}18q_1^2q_2^2 + 1{,}54q_1q_3 + 0{,}43q_1q_3^2 + 1{,}03q_1^2q_3 + 0{,}78q_1^2q_3^2 - 1{,}56q_1q_4 - 1{,}26q_1q_4^2 - 0{,}32q_1^2q_4 + 0{,}46q_1^2q_4^2 + 0{,}14q_2q_3 + 0{,}54q_2q_3^2 + 1{,}75q_2^2q_3 + 0{,}33q_2q_4 + 0{,}36q_2q_4^2 - 1{,}64q_3q_4 - 0{,}35q_3q_4^2 \quad (5.8)$$

As análises de variância (ANOVA) para as variáveis estudadas $K_L a_{O_2}$, $K_L a_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq} são apresentadas nas Tabelas 5.4 a 5.7. Avaliando-se o gráfico dos valores preditos em função dos observados (Figura 5.11), juntamente com os altos valores obtidos para o R^2 (Tabelas 5.4 a 5.7), foi verificado que os modelos representados pelas Equações 5.5 a 5.8 descreveram os dados experimentais de forma satisfatória, considerando-se todos os efeitos. A partir da ANOVA para todas as variáveis estudadas, foi verificado que os modelos propostos foram validados, já que o F calculado foi maior que o F tabelado ($F_{(0,05;27;54)}$=1,708) em todos os casos.

A partir da Figura 5.12, foi verificado que os resíduos são independentes e seguem uma distribuição normal. Considerando-se o nível inferior do fator q_2 (ar puro), os valores do $K_L a_{CO_2}$ e do CO_2^{eq} foram muito baixos, já que o CO_2 corresponde a aproximadamente 0,03% da composição do ar. Isso levou a desvios menores que o limite de detecção do equipamento, que foi igual para todas as medidas, daí o comportamento observado no ponto zero das Figuras 5.12-B e D. O pressuposto de homocedasticidade foi atendido, conforme verificado pela Figura 5.13.

Tabela 5.4 – ANOVA dos dados de $K_L a_{O_2}$

Fator	SQ	g.l.	QM	F	p-valor
q_1 (L+Q)	9967,67	2	4983,834	334,2900	0,000000
q_2 (L+Q)	631,37	2	315,685	21,1745	0,000000
q_3 (L+Q)	4071,30	2	2035,648	136,5408	0,000000
q_4 (L+Q)	1620,64	2	810,322	54,3522	0,000000
q_1 x q_2	1149,09	4	287,273	19,2688	0,000000
q_1 x q_3	13,45	4	3,362	0,2255	0,922979
q_1 x q_4	248,31	4	62,078	4,1639	0,005186
q_2 x q_3	740,95	3	246,982	16,5663	0,000000
q_2 x q_4	27,39	2	13,694	0,9185	0,405255
q_3 x q_4	1225,20	2	612,599	41,0900	0,000000
Regressão	21271,72	27	787,84	52,84	$6{,}55\text{x}10^{-30}$
Erro puro	805,07	54	14,909		
Resíduos	805,07	54	14,909		
Total	22076,79	81			

p-valor<0,05: significativo; R^2 = 0,9635; R-ajustado = 0,9453 $F_{(0,05;27;54)}$=1,708

Tabela 5.5 –ANOVA dos dados de $K_L a_{CO_2}$

Fator	SQ	g.l.	QM	F	p-valor
q_1 (L+Q)	4448,93	2	2224,47	142,817	0,000000
q_2 (L+Q)	44995,09	2	22497,55	1444,410	0,000000
q_3 (L+Q)	2445,82	2	1222,91	78,514	0,000000
q_4 (L+Q)	16809,03	2	8404,51	539,595	0,000000
q_1 x q_2	1534,26	4	383,57	24,626	0,000000
q_1 x q_3	3307,59	4	826,90	53,089	0,000000
q_1 x q_4	656,04	4	164,01	10,530	0,000002
q_2 x q_3	574,50	3	191,50	12,295	0,000003
q_2 x q_4	5442,35	2	2721,17	174,708	0,000000
q_3 x q_4	1608,33	2	804,17	51,630	0,000000
Regressão	86620,77	27	3208,18	205,92	$2{,}15\text{x}10^{-45}$
Erro puro	841,08	54	15,58		
Resíduos	841,08	54	15,58		
Total	87461,85	81			

p-valor<0,05: significativo; R^2 = 0,9904; R-ajustado = 0,9856 $F_{(0,05;27;54)}$=1,708

Tabela 5.6 –ANOVA dos dados de O_2^{eq}

Fator	SQ	g.l.	QM	F	p-valor
q_1 (L+Q)	136,16	2	68,08	18,598	0,000001
q_2 (L+Q)	37137,82	2	18568,91	5072,788	0,000000
q_3 (L+Q)	371,87	2	185,94	50,795	0,000000
q_4 (L+Q)	106,44	2	53,22	14,539	0,000009
q_1 x q_2	138,38	4	34,60	9,451	0,000007
q_1 x q_3	54,24	4	13,56	3,704	0,009775
q_1 x q_4	163,83	4	40,96	11,189	0,000001
q_2 x q_3	73,56	3	24,52	6,698	0,000632
q_2 x q_4	46,20	2	23,10	6,311	0,003444
q_3 x q_4	102,82	2	51,41	14,045	0,000012
Regressão	38797,94	27	1436,96	392,61	$6{,}98\text{x}10^{-53}$
Erro puro	197,67	54	3,66		
Resíduos	197,67	54	3,66		
Total	38995,61	81			

p-valor<0,05: significativo; R^2 = 0,9949; R-ajustado = 0,9924 $F_{(0,05;27;54)}$=1,708

Tabela 5.7 –ANOVA dos dados de CO_2^{eq}

Fator	SQ	g.l.	QM	F	p-valor
q_1 (L+Q)	31,2	2	15,58	38,5	0,000000
q_2 (L+Q)	126472,7	2	63236,33	156401,3	0,000000
q_3 (L+Q)	24,5	2	12,23	30,3	0,000000
q_4 (L+Q)	118,1	2	59,03	146,0	0,000000
q_1 x q_2	47,2	4	11,81	29,2	0,000000
q_1 x q_3	149,6	4	37,40	92,5	0,000000
q_1 x q_4	39,3	4	9,83	24,3	0,000000
q_2 x q_3	36,3	3	12,09	29,9	0,000000
q_2 x q_4	5,0	2	2,50	6,2	0,003852
q_3 x q_4	50,2	2	25,10	62,1	0,000000
Regressão	129560,8	27	4798,55	11996,37	$6{,}76\text{x}10^{-93}$
Erro puro	21,8	54	0,40		
Resíduos	21,8	54	0,40		
Total	129582,6	81			

p-valor<0,05: significativo; R^2 = 0,9998; R-ajustado = 0,9997 $F_{(0,05;27;54)}$=1,708

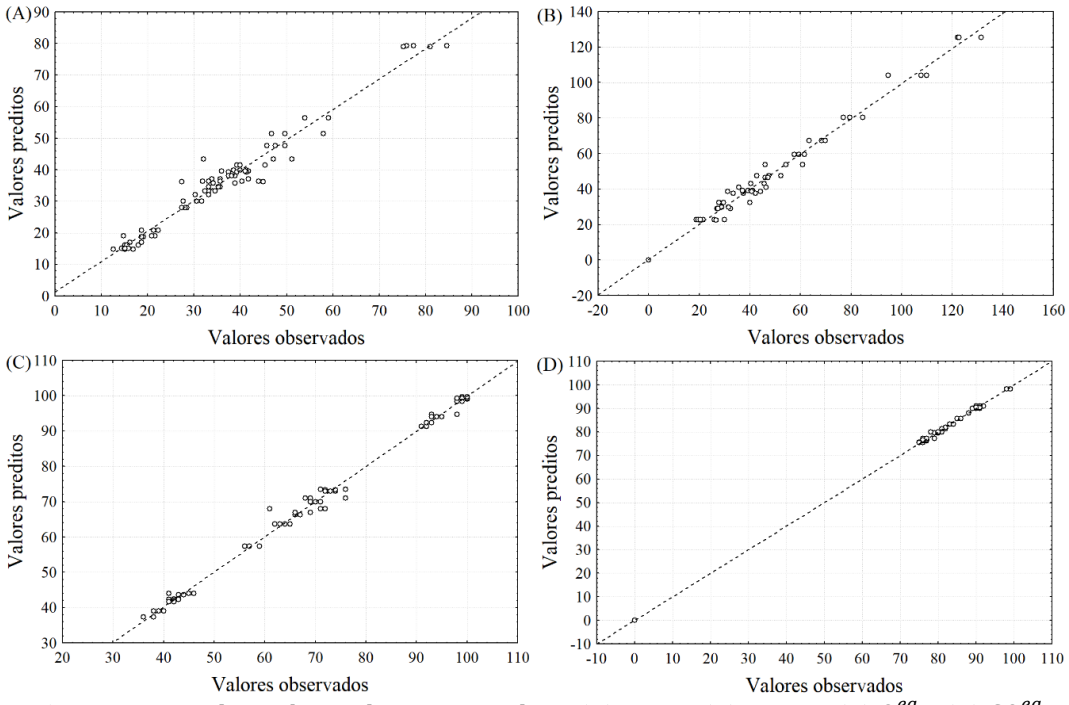

Figura 5.11 – Valores observados versus preditos: (A) $K_L a_{O_2}$; (B) $K_L a_{CO_2}$; (C) O_2^{eq} e (D) CO_2^{eq}

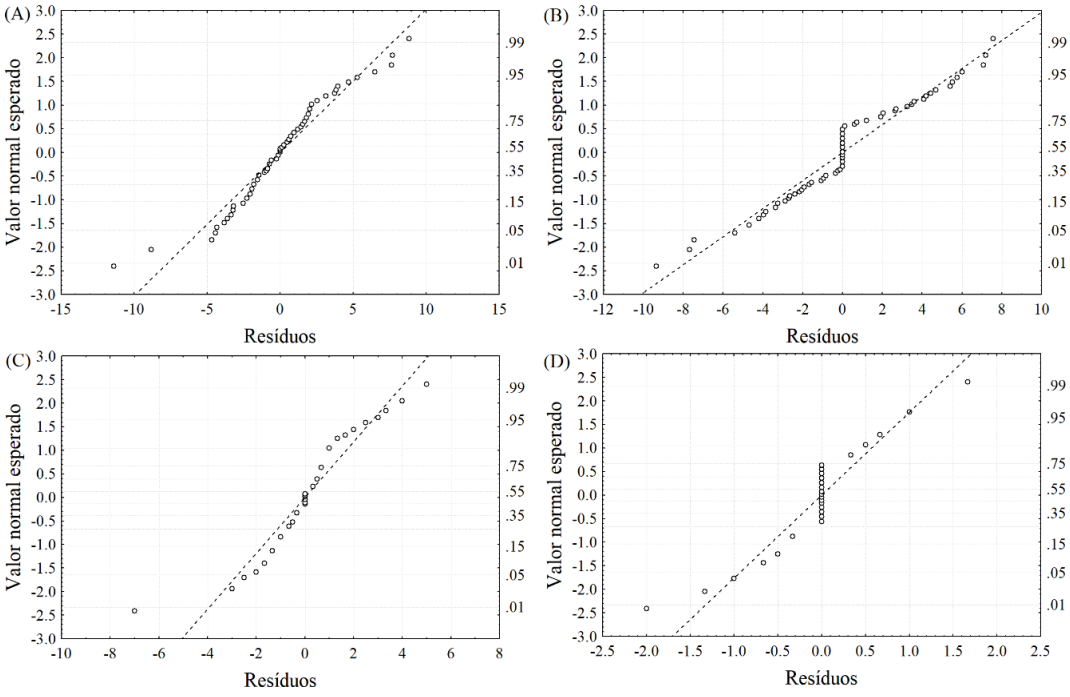

Figura 5.12 – Valor normal esperado versus resíduos para as variáveis: (A) $K_L a_{O_2}$; (B) $K_L a_{CO_2}$; (C) O_2^{eq} e (D) CO_2^{eq}

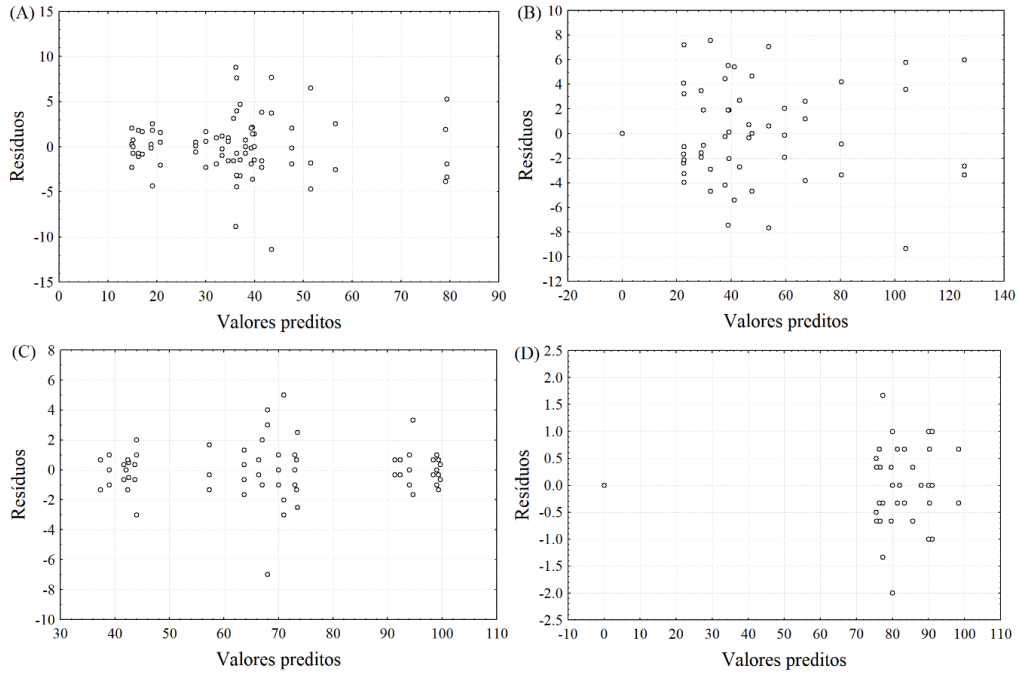

Figura 5.13 – Resíduos versus valores preditos para as variáveis: (A) $K_L a_{O_2}$; (B) $K_L a_{CO_2}$; (C) O_2^{eq} e (D) CO_2^{eq}

A partir do estudo dos dados experimentais da TM utilizando o planejamento fatorial fracionado, verificou-se quais efeitos influenciam de forma mais significativa em cada parâmetro estudado. Além disso, foram obtidas equações estatisticamente válidas para descrever o comportamento dos parâmetros de transferência de massa em função de condições ajustáveis do sistema. Estas equações podem ser incorporadas ao modelo complexo formulado no quarto nível hierárquico do estudo do processo de cultivo.

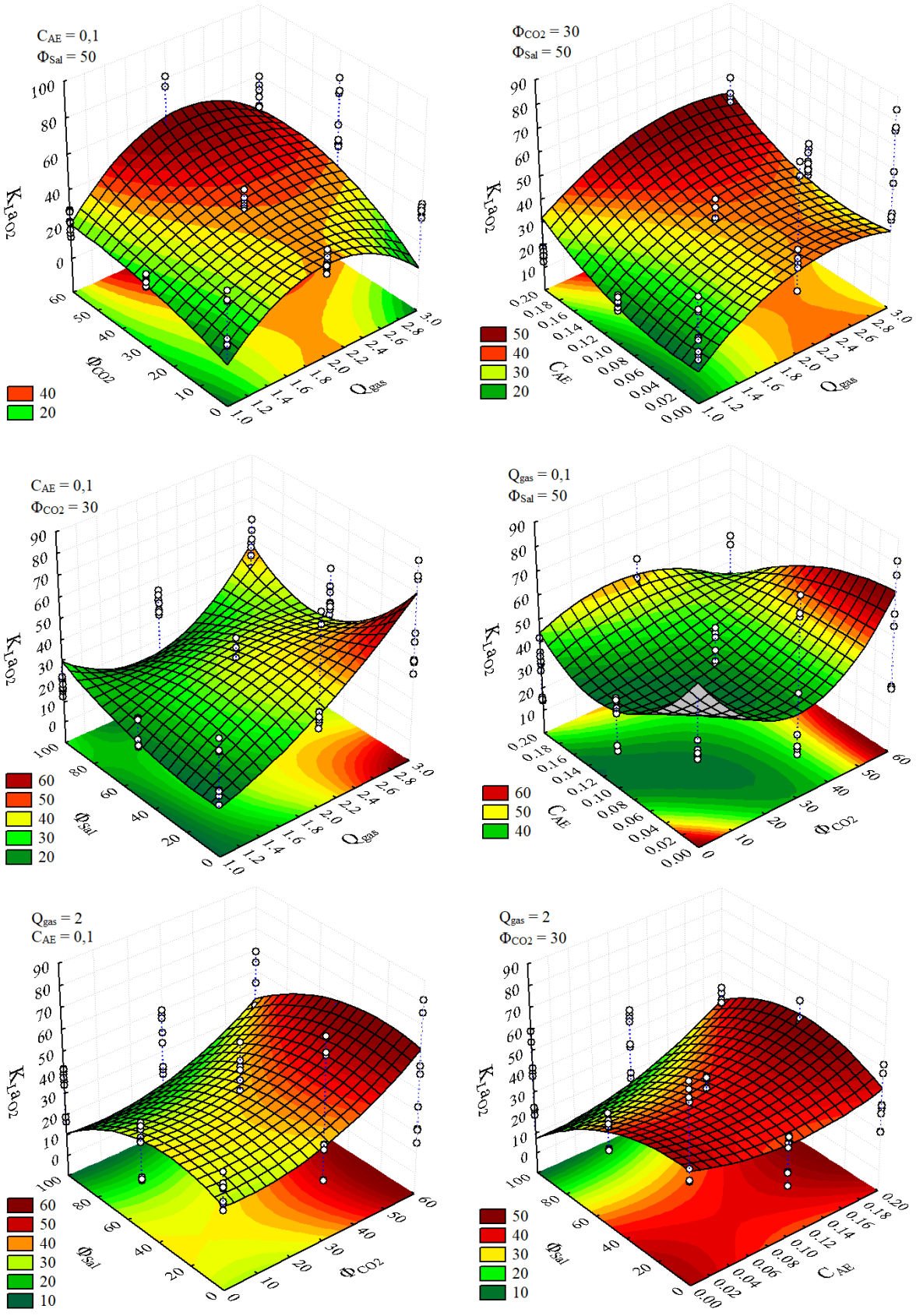

Figura 5.14 – Superfícies de resposta para a variável $K_L a_{O_2}$

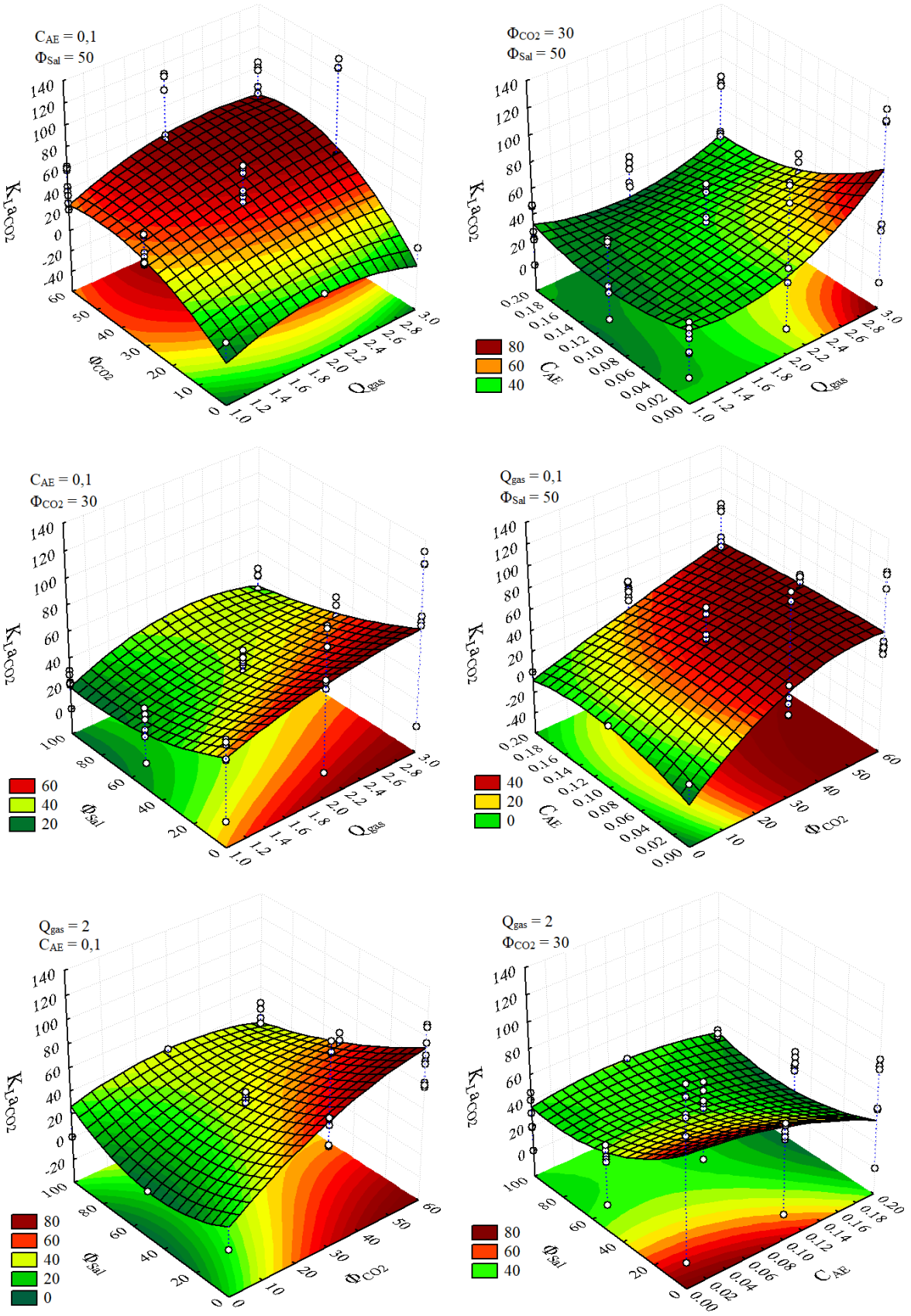

Figura 5.15 – Superfícies de resposta de $K_L a_{CO_2}$

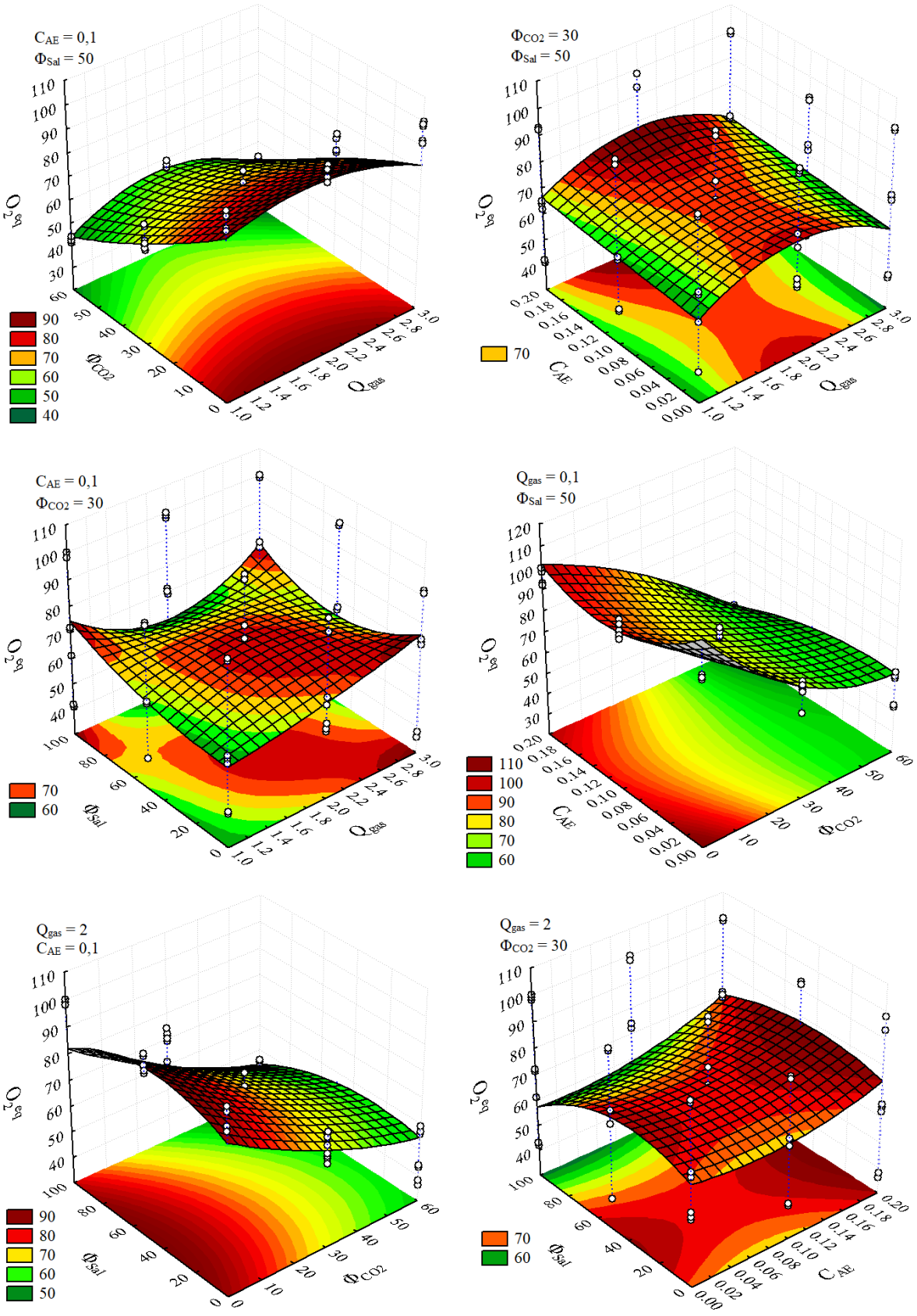

Figura 5.16 – Superfícies de resposta de O_2^{eq}

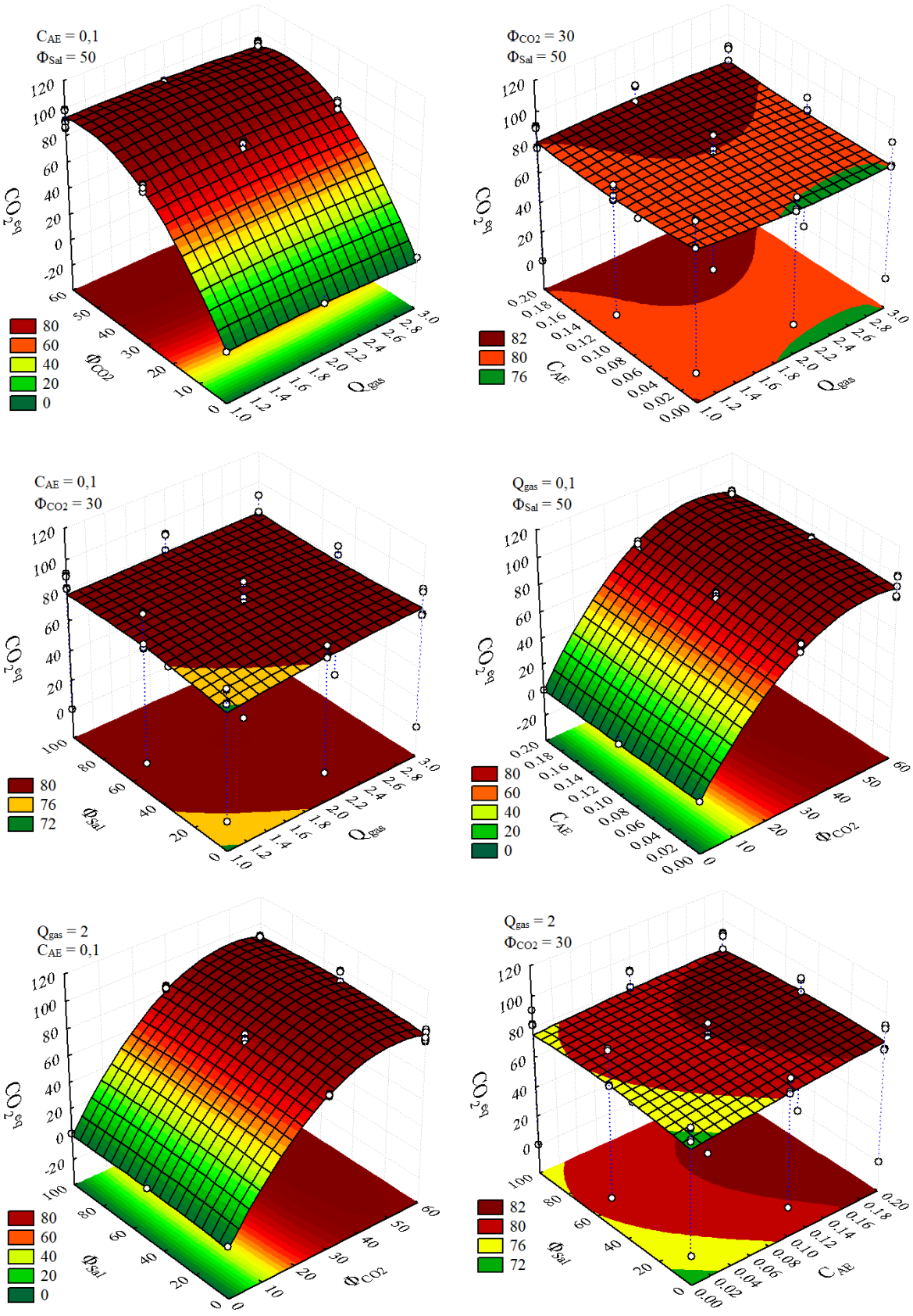

Figura 5.17 – Superfícies de resposta de CO_2^{eq}

5.2.1.3 Estudo da hidrodinâmica – Computacional

A utilização de dispersores de bolhas no interior dos PBRs é interessante para o crescimento celular devido ao efeito de luz intermitente produzido pelo movimento do fluido, que é induzido pelo módulo. Uma vez que as bolhas causam turbulência de alta intensidade, um fluxo considerando apenas água foi primeiramente estudado para se avaliar com mais clareza o movimento global do fluido no meio.

A partir da simulação do fluxo monofásico em regime estacionário no interior do PBR_2 com diferentes configurações (Figura 4.4), foi obtida a Figura 5.18, cuja superfície representa a velocidade da água em função da sua posição dentro do volume de controle. Conforme mostrado na Figura 5.18, há uma diferença significativa entre a trajetória do fluxo em cada caso estudado. Para o PBR_A sugere-se que as células localizadas no centro do PBR (porção escura) continuariam naquela parcela a partir de cerca de 25 cm de altura. Abaixo desta altura, a simulação sugere que existe movimento em outras direções. Semelhantemente, as células que estariam localizadas na parte externa do PBR (porção iluminada) continuariam neste caminho. Este efeito causaria não apenas a falta de energia luminosa para as células na porção interna do PBR (escura), mas também a superestimulação centro fotossintético (CFS) das células concentradas na parte externa do PBR (iluminada), que não teriam tempo no escuro para se recuperar, reduzindo a eficiência fotossintética do sistema. Conforme apontado por diversos autores (MYERS E BURR, 1940; KOK, 1956), a recuperação do CSF após uma superestimulação pode levar um longo período de tempo.

Por outro lado, ao analisar a Figura 5.18 para o PBR_B e PBR_C verificou-se que a adição de defletores horizontais ao PBR modifica drasticamente o fluxo do fluido dentro do reator. Esta alteração pode melhorar o efeito da luz intermitente, forçando as células a se moverem pelo caminho horizontal e aumentando as chances de que as mesmas se aproximem das paredes, absorvam energia luminosa e voltem ao centro para finalizar a fotossíntese e recuperar o CSF. Não houve diferenças visivelmente significativas no fluxo ao usar ambos os dispersores, os quais caracterizam os PBR_B e PBR_C (ver Figura 5.18), respectivamente.

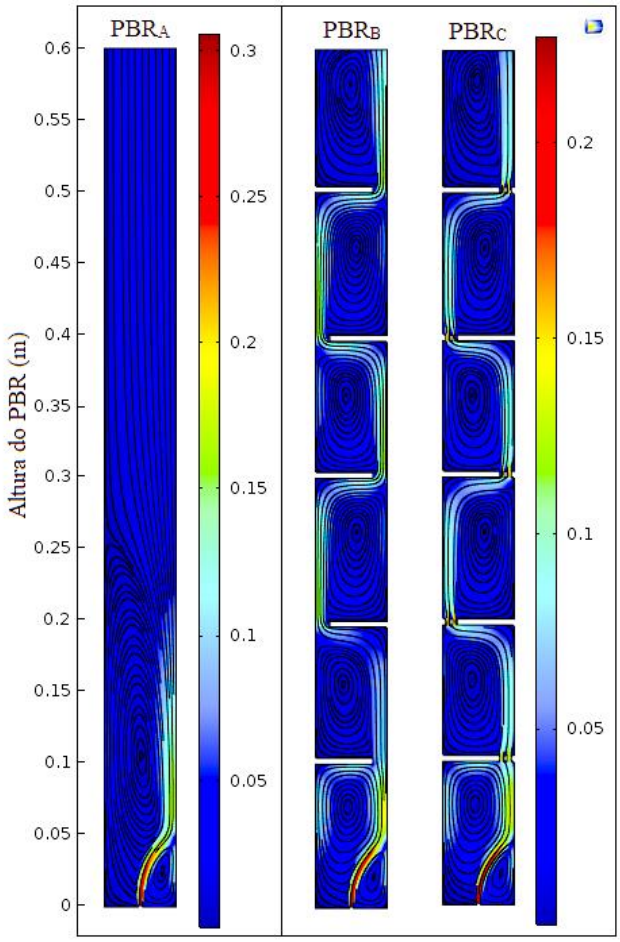

Figura 5.18 – Simulação do fluxo monofásico no interior do PBR_2, onde a superfície de resposta representa a magnitude da velocidade (m s^{-1}) e as linhas denotam o campo de velocidade

As simulações considerando a influência das bolhas, apresentadas na Figura 5.19, mostraram meios altamente misturados para todas as configurações de PBR estudadas. Embora as simulações apresentadas na Figura 5.19 sugiram meios visualmente bem misturados, isso não garante que o efeito da luz intermitente seja alcançado. Assim, para mais uma forma de suportar a hipótese da existência e melhoramento do efeito desejado, foi construída a Figura 5.20, que mostra o componente x do campo de velocidade relativa ao longo da altura do PBR (coordenada y) no centro e próximo às paredes iluminadas. A partir das Figuras 5.20-A a F, pode-se afirmar que o efeito de luz intermitente foi promovido em todos os PBRs, já que a direção da componente x do campo de velocidade mudou continuamente, em ambas as posições testadas. A intensidade de turbulência (IT) foi calculada como sendo a raiz quadrada da flutuação quadrática média, com o intuito de avaliar indiretamente a frequência do efeito de luz pulsante, já que maiores flutuações na direção normal às paredes iluminadas podem contribuir para maiores frequências nos ciclos claro/escuro. Os valores de IT calculados a partir das flutuações de velocidade no centro dos

PBRs foram consideravelmente maiores que aquelas encontradas nas paredes, o que era esperado devido ao princípio de adesão, que leva a uma condição de contorno na qual a velocidade é nula. O valor máximo de IT foi encontrado para o PBR_C, tanto no centro quanto nas paredes. Considerando-se o centro, os valores encontrados para os PBR_A e PBR_B foram 82 e 79% do máximo do PBR_C, respectivamente. Nas paredes, os valores encontrados para os PBR_A e PBR_B foram 87 e 85% do PBR_C, respectivamente. Assim, foi sugerido que o PBR_C tem a capacidade de promover maior frequência dos ciclos claro/escuro quando comparado aos outros dois PBRs.

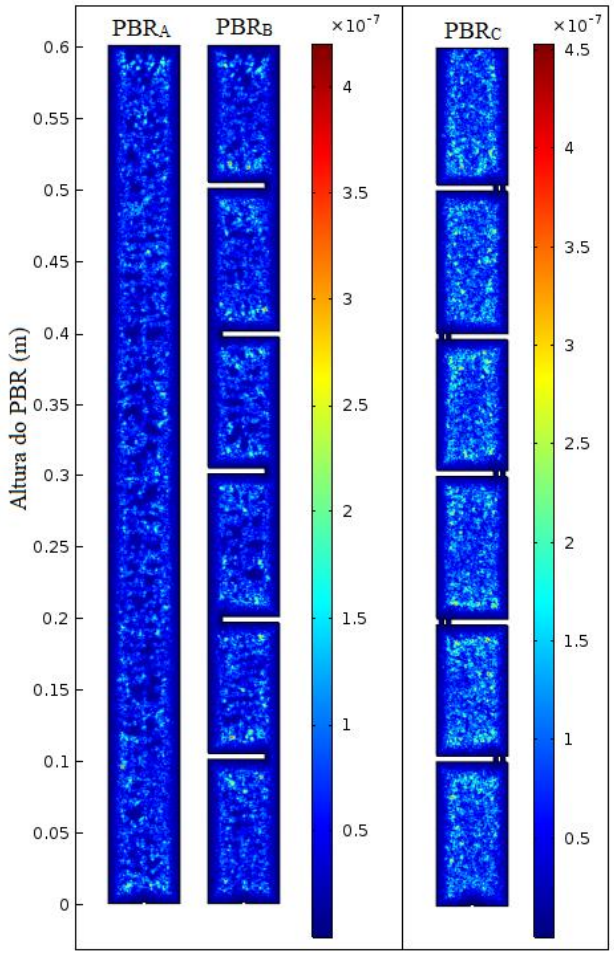

Figura 5.19 – Simulação do fluxo multifásico no interior do PBR_2 onde a superfície representa a magnitude da velocidade (m s^{-1}) e as linhas denotam o campo de velocidade

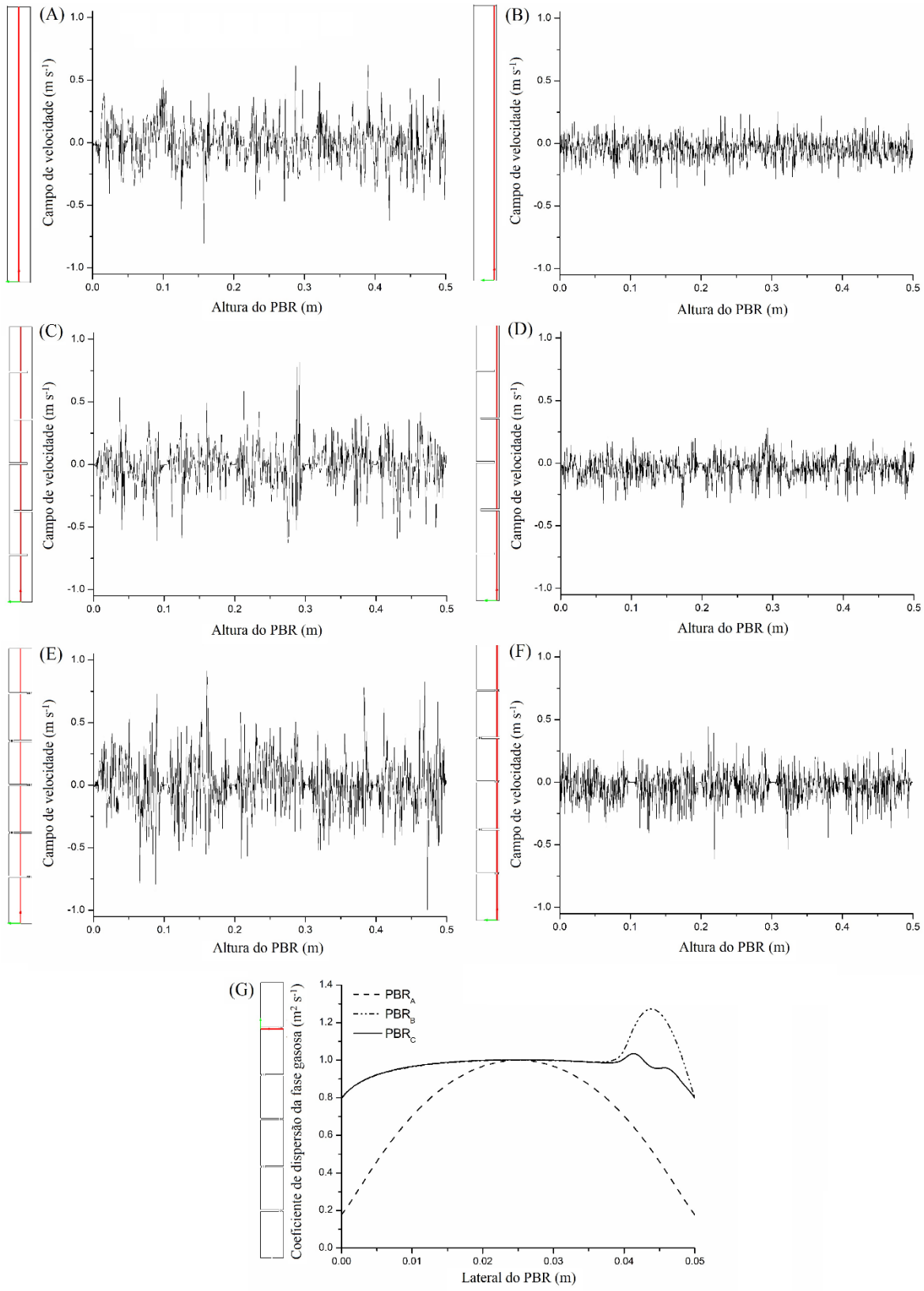

Figura 5.20 – Perfil de velocidade em função da altura do PBR para: (A) e (B) PBR_A; (C) e (D) PBR_B; (E) e (F) PBR_C e (G) coeficiente de dispersão da fase gasosa em função do comprimento lateral do PBR. As linhas de corte apresentam-se ao lado dos gráficos.

Mesmo não sendo predito pelo modelo, os pequenos orifícios presentes nos dispersores complexos podem quebrar as bolhas maiores, aumentando a área de contato entre as fases, e consequentemente aumentando a transferência de massa. Isso sugere um melhoramento na disponibilidade de carbono inorgânico no meio. Esta suposição foi suportada pela Figura 5.20-G, que mostrou que o módulo dispersor do PBR_C promoveu uma turbulência maior, já que o perfil do coeficiente de dispersão da fase gasosa apresentou comportamento mais próximo à um fluxo empistonado, característico de regimes turbulentos.

Todos os resultados obtidos a partir das simulações da FDC (Figuras 5.18 a 5.20) indicaram que os dispersores do PBR_C podem aumentar o crescimento da biomassa ainda mais que aqueles do PBR_B. Assim, o PBR_A e PBR_C foram construídos e avaliados experimentalmente para verificar a influência do módulo proposto sobre o crescimento celular.

5.2.1.4 Influência do módulo de dispersão de bolhas sobre o crescimento celular

Com o intuito de manter-se as mesmas condições de luz, temperatura e concentração de CO_2 na corrente de ar injetada, os experimentos em PBR com e sem o módulo interno de dispersão de bolhas foram realizados em paralelo, sendo utilizado um refletor de LED para os dois PBRs. Isso fez com que a intensidade luminosa incidente em cada reator fosse menor que aquela alcançada quando o refletor foi direcionado a apenas um reator. Assim, como visto na Figura 5.21, a taxa de crescimento foi menor neste caso quando comparado com os dados da Figura 5.24.

Analisando-se os dados da Figura 5.21, foi verificado um aumento claro na concentração de biomassa no PBR_C quando comparado ao PBR_A. A partir dos dados coletados nas primeiras 50 horas de cultivo, pode ser notado que enquanto a concentração de biomassa era baixa (< 2 g L^{-1}), a presença do módulo não causou alterações significativas no crescimento celular, já que as concentrações obtidas foram bem similares. O mesmo resultado foi encontrado por Quiang e Richmond (1996), que não observaram influência da taxa de agitação de 0,6 a 4,2 g L^{-1} em culturas com menos de 2 g L^{-1}. Por outro lado, após a concentração atingir valores acima de 2 g L^{-1}, o rendimento em biomassa aumentou significativamente com o módulo, chegando a 15,7 g L^{-1}, aproximadamente 175% maior que os 5,7 g L^{-1} obtidos com o PBR_A. Isso ocorreu pois em baixas concentrações de biomassa a

luz penetra no reator sem dificuldades, fazendo com que a maior parte das células receba energia luminosa. A partir de determinados valores de concentração de biomassa essa penetração da luz se torna mais difícil devido ao sombreamento que as células provocam umas nas outras. Utilizando defletores similares aos do PBR_B, Degen e colaboradores (2001) alcançaram um aumento de cerca de 20% na produção de biomassa (de 3,5 a 4,2 g L^{-1}, aproximadamente), em um *airlift* de placas planas, quando comparado ao controle.

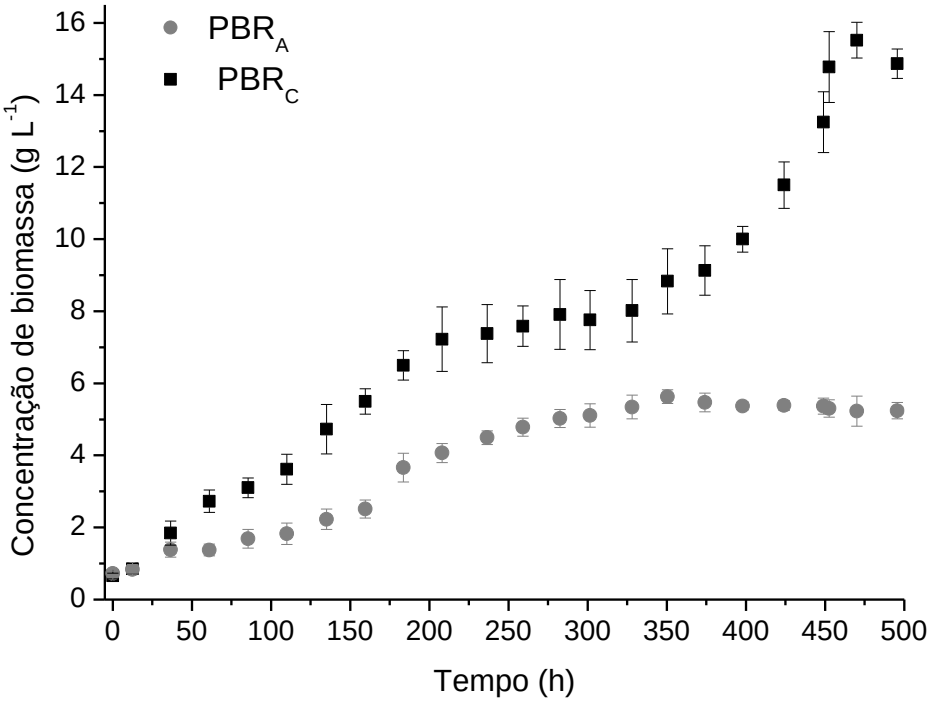

Figura 5.21 – Perfil de crescimento de *P. malhamensis* em PBR com e sem o módulo interno de dispersão de bolhas

Para suportar a cultura de densidade ultra alta, foi realizada a análise estequiométrica dos nutrientes fornecidos pelos meios. A composição elementar das células foi determinada, indicando 4,99% de N e 0,98% de P (massa/massa), que dá uma razão N/P de aproximadamente 10. Contanto que a N/P do meio seja menor que a N/P da biomassa, o crescimento é limitado pela quantidade de N. Considerando-se que foi adicionado 0,42 g N pelo meio de cultivo (3 vezes concentrado), teoricamente seria possível produzir 25 g L^{-1} de biomassa. Estes valores indicam, que não houve limitação do crescimento pela indisponibilidade de nutrientes.

Além do considerável aumento na produção de biomassa, deve-se notar também que o valor de concentração final obtido no PBR_C foi muito significativo para um sistema fotoautotrófico de cultivo de 10 L (larga escala). Isso porque para sistemas de microalgas,

culturas com concentração de biomassa de 5 a 10 g L^{-1} podem ser classificados como "culturas de alta densidade" (CAD), enquanto concentrações acima de 10 g L^{-1} caracterizam culturas de densidade ultra alta" (CDUA) (ALAGESAN *et al*., 2013; HU *et al*., 1998b; KROUMOV *et al*., 2016). Embora existam diversos trabalhos que explorem a produção de microalgas em PBRs de placas planas, os valores de concentração final obtidos são, geralmente, muito menores, como pode ser observado pelos trabalhos de Kandilian e colaboradores (2014), Wang e colaboradores (2014) e Xia e colaboradores (2018), que alcançaram 2,08; 0,91 e 1,11 g L^{-1}, respectivamente.

Além disso, existem trabalhos que aplicam técnicas como a CFD ou defletores para melhorar a produção de biomassa, mas os valores finais ainda são significativamente menores que o obtido neste trabalho, como é o caso do estudo de Huang e colaboradores (2015), que, aplicando a CFD, aumentaram a produção de 0,67 para 0,89 g L^{-1}.

De maneira geral, todos os resultados obtidos, computacionais e experimentais, sugeriram que a adição de um dispersor de bolhas melhorou significantemente o fluxo dos fluidos em direção ao efeito de luz intermitente. Isso que aumenta consideravelmente as chances de as células chegarem perto das paredes, onde os fótons estão disponíveis, e voltarem para a porção mais escura do PBR, onde elas podem finalizar a fotossíntese e recuperar seus centros fotossintéticos.

5.2.1.5 Considerações finais – Nível I

No primeiro nível hierárquico, foram estudadas as características de transferência de massa e da hidrodinâmica do PBR de 10 L proposto (ver Figura 4.4-E). A partir da modelagem matemática da TM, foram encontradas equações diferenciais ordinárias para descrever a variação na concentração de gases dissolvidos em função do tempo. Além disso, o planejamento fatorial fracionado, considerando 4 fatores e 3 níveis, permitiu a obtenção de equações que determinam os parâmetros da TM (K_La e C^{eq}) a partir das variáveis ajustáveis do sistema experimental.

No estudo da fluidodinâmica, a FDC permitiu determinar o módulo de dispersão de bolhas proposto que produziria a maior concentração de biomassa, diminuindo os custos, o tempo e os trabalhos laboratoriais. O PBR apontado como o melhor para a produção de biomassa (PBR_C) foi construído e avaliado experimentalmente, provando o resultado

sugerido pelas simulações, já que a utilização do módulo interno aumentou a produção de biomassa em aproximadamente 175%.

5.2.2 Segundo nível hierárquico – Estudo da microalga

No segundo nível hierárquico, foi estudada a tolerância da microalga *Poterioochromonas malhamensis* frente aos parâmetros ajustáveis do processo: T, ϕ_{CO2}, Q_{gas}, I_{av} e pH, bem como sua necessidade nutricional e a otimização dos meios M-8 e BG-11 para esta cepa específica.

5.2.2.1 Avaliação da tolerância da cepa frente às diferentes condições do sistema

Neste subsistema, foi estudada a tolerância da cepa ao CO_2 fornecido, às condições de iluminação, vazão de gás, temperatura e pH. A nomenclatura PBR1 e PBR2 representa as culturas fotoautotrófica e mixotrófica, respectivamente.

A Figura 5.22 mostra a curva de crescimento da microalga *Poterioochromonas malhamensis* utilizando-se a técnica de pulsos. Para o cultivo fotoautotrófico a máxima concentração observada foi de 14,5 g L^{-1}, sendo que para o cultivo mixotrófico esse valor foi de 12,5 g L^{-1}.

A partir da análise da Figura 5.22, é possível verificar que a cepa utilizada é tolerante a 15% de CO_2, não apresentando inibição no seu crescimento. A partir da análise da vazão do ar injetado (Q_{ar}) nos PBRs, foi possível verificar que a cepa não sofreu com a tensão de cisalhamento até 4 L L^{-1} min^{-1} (máximo valor utilizado).

A intensidade luminosa variou bastante durante o experimento pois a lâmpada de vapor metálico utilizada emite muito calor, tendo que ser afastada em dias muito quentes. Assim, o controle da temperatura do cultivo foi realizado por meio da aproximação e afastamento da lâmpada. Considerando que a concentração da biomassa aumentou significativamente (>14 g L^{-1}) durante o tempo de cultivo e, mesmo com baixa intensidade luminosa (entre 250 e 500 h) as células continuaram crescendo, pode ser concluído que a vazão utilizada associada com o módulo de dispersão de bolas foi suficiente para minimizar o efeito de sombreamento pela alta concentração celular.

Até aproximadamente 330 h de cultivo, as condições operacionais impostas aos dois PBR foram iguais, o que pode ser observado pelo comportamento dos perfis de crescimento apresentados na Figura 5.22, que foram muito similares. Da mesma forma, comportamentos próximos foram verificados entre 110 e 140 horas, aproximadamente, período em que a cultura ficou sem a injeção de CO_2, indicando que o CO_2 presente no ar não foi suficiente para o crescimento celular.

Após aproximadamente 210 h de cultivo, foi retirado 1 L de cultura de cada PBR, e foram adicionados água e meio nos PBR1 e PBR2, respectivamente. Como não houve diferença no crescimento após esta adição até aproximadamente 360 h, pode-se concluir que os nutrientes ainda não estavam escassos. Pela diferença no crescimento das duas culturas entre 360 e 400 h foi verificado que a microalga utilizada consome o carbono orgânico adicionado na forma de álcool etílico, fornecendo alta taxa de crescimento. A partir daí a concentração no PBR2 se manteve praticamente constante, mesmo após a diluição da cultura em aproximadamente 630 h, a concentração chegou ao mesmo patamar, de aproximadamente 12 g L^{-1}, indicando que a capacidade máxima do PBR para cultivo mixotrófico foi atingida.

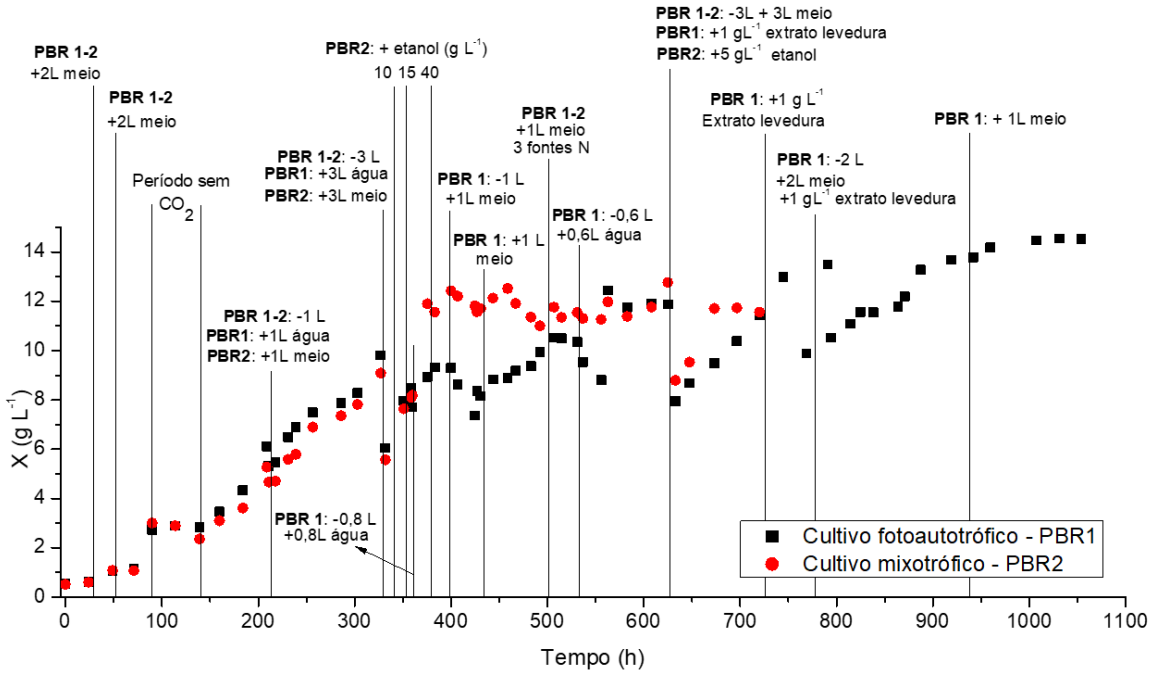

Figura 5.22 – Perfil de crescimento da microalga *P. malhamensis* sem limitações

Considerando-se o PBR1, foram calculadas as taxas de crescimento (Figura 5.23) para diferentes intervalos de tempo, cujas condições experimentais são apresentadas na

Tabela 5.8. Avaliando-se o pH dos intervalos 1 e 2, foi observado que mesmo reduzindo a fração de CO_2 no gás de entrada (ϕ_{CO2}) de 15 para 2 %, não houve escassez de CO_2 no meio, o que ocasionaria um aumento drástico no valor do pH. Neste caso, deve ser levado em consideração também, que a vazão de gás (Q_{gas}) aumentou de 1 para 3 L L^{-1} min^{-1}, o que fornece maior quantidade de CO_2 por tempo. Além disso, a taxa de crescimento observada nestes dois intervalos foi muito próxima, o que leva à conclusão que a redução observada na intensidade de luz média, que foi de 500 e 200 μmol m^{-2} s^{-1} nos intervalos 1 e 2, respectivamente, não ocasionou limitação do crescimento, já que a temperatura foi mantida na mesma faixa.

Por outro lado, comparando-se o intervalo 3 com os intervalos 1 e 2, foi verificado que a redução na temperatura média de 31 e 32 para 25 °C, mantendo-se as outras condições constantes, ocasionou uma redução de aproximadamente 35% na taxa de crescimento, indicando que as células respondem melhor a temperaturas mais elevadas – acima de 30 °C.

Tabela 5.8 – Condições operacionais médias dos intervalos de crescimento avaliados

Intervalo	Intervalo (h)	Temperatura (°C)	Φ_{CO2} (%)	Q_{gas} L L^{-1} min^{-1}	I_{av} (μmol m^{-2} s^{-1})	pH	dX/dt g L^{-1} h^{-1}
1	139 – 327	29 – 32	15	1 – 1,5	500	7,26	0,036
2	351 – 383	30 – 33	2 – 3	3	200	7,64	0,039
3	431 – 492	23 – 27	2	3	200	7,32	0,024
4	633 – 696	27 – 32	2	4	300	7,49	0,037
5	696 – 745	29 – 32	2	4	650	7,34	0,054
6	794 – 887	29 - 36	5	4	350	7,28	0,030

A importância da intensidade luminosa incidente no PBR pode ser confirmada pela taxa de crescimento observada nos intervalos 4 e 5, que, mesmo com a maior concentração de biomassa, apresentou um aumento de aproximadamente 30%, a partir do aumento de I_{av} de 300 para 650 μmol m^{-2} s^{-1}.

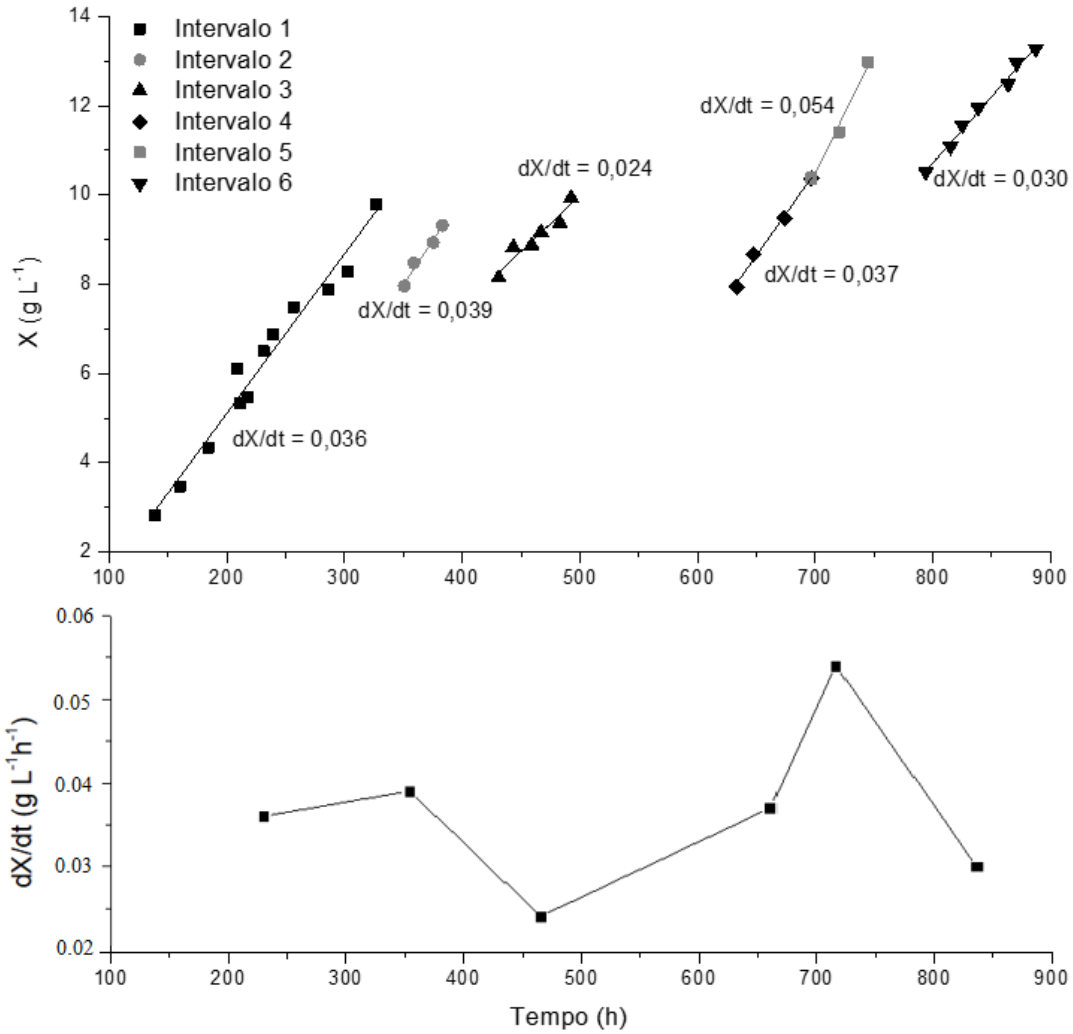

Figura 5.23 – taxa de crescimento para diversos intervalos do cultivo de *P.malhamensis*

A partir destes resultados foi realizado outro experimento fotoautotrófico, ao qual foram aplicadas as condições observadas como favoráveis ao crescimento celular (Figura 5.24). Analisando-se a Figura 5.24, é possível verificar que as taxas de crescimento (dX/dt) obtidas foram aproximadamente o dobro daquelas encontradas na maior parte dos intervalos apresentados na Figura 5.23. Isso permitiu que a cultura atingisse a concentração de biomassa máxima (14,5 g L^{-1}) em cerca de 280 h de cultivo, confirmando as condições sugeridas como melhores ao crescimento pelos dados do cultivo de pulsos (Figura 5.22).

Aplicando-se a técnica de pulsos, com apenas um cultivo, foi possível entender o processo e avaliar informações de diversos parâmetros ajustáveis do sistema, como temperatura, intensidade luminosa, pH, concentração de CO_2 na corrente de entrada e vazão de entrada de gás, sobre a resposta do processo. Esta técnica reduziu consideravelmente a quantidade de experimentos necessários para a compreensão do cultivo, diminuindo custos e tempo de trabalho.

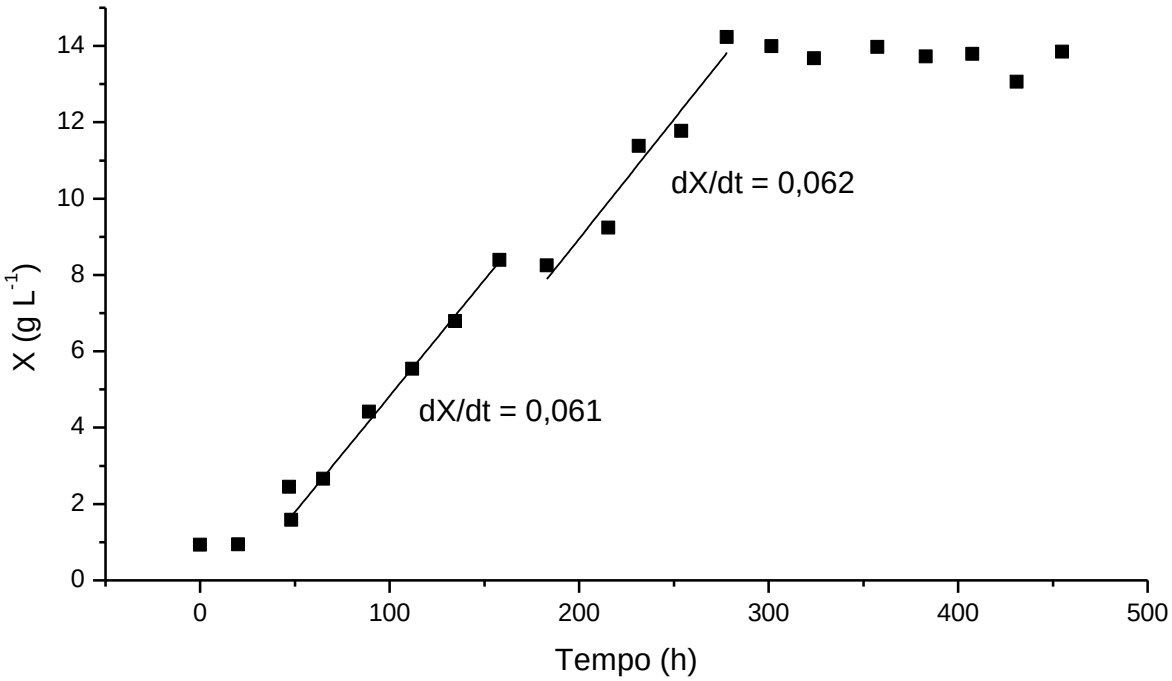

Figura 5.24 – Perfil de crescimento da microalga *P. malhamensis* utilizando-se as condições favoráveis ao crescimento

5.2.2.2 Otimização do meio de cultivo

Neste subsistema foi estudada a composição elementar da biomassa de *Poterioochromonas malhamensis* (Tabela 5.9), a fim de se determinar a composição mínima do meio de cultivo necessária para a produção de 1 g L^{-1} de células. Embora a composição celular seja modificada em função do tempo de cultivo, do meio nutricional, ou de condições experimentais, a definição de um meio otimizado é interessante para diminuir a quantidade de nutrientes não utilizada após o cultivo, reduzindo custos desnecessários. A biomassa utilizada foi proveniente da cultura realizada no PBR de 10 L apresentada na Figura 5.24.

As Equações 5.9 e 5.10 representam a FO desenvolvida para minimizar a quantidade utilizada de cada fonte de nutriente e as restrições às quais a FO foi sujeita, construídas com base na Tabela 5.9.

$$minimizeFO = \sum_{j=1}^{N_f} Z_j \tag{5.9}$$

$$R_i = \sum_{j=1}^{N_f} \left(Z_j \frac{MA_i}{MM_j} \right) \geq f_i \tag{5.10}$$

Sendo N_f número de fontes de nutrientes utilizadas; Z_j quantidade da fonte "j" necessária para produzir 1 g de biomassa, "i" o número de elementos encontrados na biomassa; MA_i massa atômica do elemento "i" (g mol^{-1}) e MM_j massa molecular do composto "j" (g mol^{-1}).

Tabela 5.9 – Composição elementar da biomassa de *P. malhamensis*

Elemento	Concentração (mg kg^{-1})	Fração (%)
N	49900	4,99000
P	9808	0,98083
S	5840	0,58400
Mg	2323	0,23230
Na	2323	0,23230
K	1268	0,12684
Ca	265	0,02655
Fe	3,96	0,00040
Mn	47	0,00471
Zn	38	0,00383
Cu	37	0,00365
B	1,97	0,00020
Ni	1,75	0,00018

A partir da solução do sistema de equações composto pela Equação 5.9 e pelas "i" restrições (Equação 5.10), os meios M-8 e BG-11 foram otimizados para conter a menor quantidade de cada fonte de nutrientes necessária para a produção de 1 g de biomassa de *Poterioochromonas malhamensis* por litro. A quantidade de biomassa que se pode alcançar utilizando-se cada meio original foi calculada com base na concentração de nitrogênio na sua composição, sendo 8,32 g_X L^{-1} para o M-8 e 4,96 g_X L^{-1} para o BG-11. Assim, a composição apresentada na Tabela 5.10 representa a quantidade de cada composto com relação do nitrogênio presente por grama de biomassa por litro. Os meios otimizados foram chamados de M-8* e BG-11* e suas composições estão apresentadas na Tabela 5.10.

Analisando-se os resultados obtidos para a composição ótima do meio M-8 foi verificado que este contém todos os nutrientes em excesso, ou seja, com a quantidade de nitrogênio presente, os demais compostos não serão completamente metabolizados. Essa utilização excessiva de nutrientes acarreta em um aumento considerável no custo do processo. Já com relação ao BG-11 foi verificada deficiência de todos os nutrientes, exceto

o manganês, indicando que o nitrogênio adicionado não será totalmente utilizado e o rendimento do cultivo será menor que o esperado.

Tabela 5.10 – Composição dos meios M-8 e BG-11 originais e otimizados

Composto	Concentração (mg g_X^{-1} L^{-1})			
	M-8	**M-8***	**BG-11**	**BG-11***
KNO_3	360,58	360,35	–	–
$NaNO_3$	–	–	302,42	302,96
KH_2PO_4	88,94	36,20	–	–
K_2HPO_4	–	–	8,06	55,12
$MgSO_4.7H_2O$	48,08	44,58	15,12	44,60
$CaCl_2.2H_2O$	1,56	0,97	7,26	0,98
Ácido cítrico.H_2O	–	–	1,21	0,00
Citrato de amônio e ferro III	–	–	1,21	$1,9\ 10^{-2}$
$Na_2EDTA.2H_2O$	–	–	0,20	0,00
FeEDTA	1,20	0,00	–	–
$FeSO_4.7H_2O$	15,63	$1,99\ 10^{-2}$	–	–
$Na_2HPO_4.2H_2O$	31,25	15,23	–	–
Na_2CO_3	–	–	4,03	0,00
H_3BO_3	–	$1,14\ 10^{-2}$	0,58	$1,14\ 10^{-2}$
$MnCl_2.4H_2O$	1,56	0,17	0,36	0,17
$ZnSO_4.7H_2O$	0,38	0,17	0,05	0,17
$Na_2MoO_4.2H_2O$	–	–	0,08	–
$CuSO_4.5H_2O$	0,22	0,14	0,02	0,14
$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	0,43	–	–	–
$NiCl_2.6H_2O$	–	$7,3\ 10^{-3}$	–	$7,3\ 10^{-3}$

M-8* e BG-11* – meios M-8 e BG-11 otimizados

O composto $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ (fonte de alumínio do meio M-8) não foi considerado no procedimento de otimização do meio pois esse elemento não apresentou concentração considerável na biomassa de *Poterioochromonas malhamensis* (ver Tabela 5.9). Por outro lado, o H_3BO_3, que não estava presente no meio M-8 foi adicionado ao M-8*, pois esse elemento foi verificado na composição da biomassa (ver Tabela 5.9). Da mesma forma, em ambos os meios otimizados foi adicionada uma fonte de níquel, o $NiCl_2.6H_2O$.

As concentrações ótimas de FeEDTA (M-8) e $Na_2EDTA.2H_2O$ (BG-11) foram iguais a zero, conforme esperado, pois estes compostos não são adicionados como nutrientes, mas sim como agentes quelantes para evitar precipitações de ferro. O mesmo ocorreu para o

Na_2CO_3 e para o ácido cítrico.H_2O, ambos do meio BG-11, que são adicionados como tampão e acidificante, respectivamente.

Utilizando-se os resultados obtidos a partir da PML (Tabela 5.10), os meios originais e otimizados foram preparados e utilizados em cultivos nos PBRs tubulares de 250 mL.

5.2.2.3 Influência da composição do meio de cultivo sobre o crescimento e a composição centesimal das células

Os perfis de crescimento de biomassa dos cultivos utilizando-se os meios M-8 e BG-11, originais e propostos a partir da PML, estão apresentados na Figura 5.25, que mostra que a concentração máxima de biomassa atingiu valores próximos àquele calculado no preparo dos meios (10 g L^{-1}). A fase estacionária foi atingida após aproximadamente 210 h de cultivo, exceto para o BG-11*, que foi em aproximadamente 120 h. Na Tabela 5.11, são apresentadas as médias e erro padrão das variáveis estudadas biomassa, proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides, em valores proporcionais e absolutos. Analisando-se os resultados, foram verificados valores próximos de biomassa final para todos os meios, exceto o BG-11 otimizado.

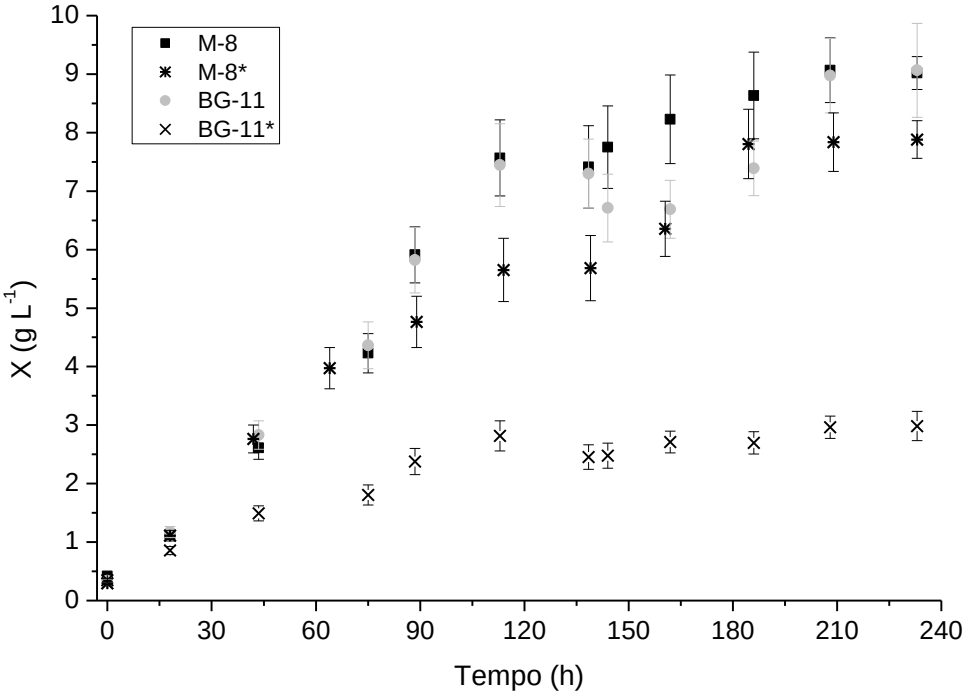

Figura 5.25 – Perfil de crescimento da microalga utilizando-se os meios M-8 e BG-11 originais e otimizados

Tabela 5.11 – Concentração de biomassa e teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos da microalga *P. malhamensis* em função do meio de cultivo

	Unidade	M-8	M-8*	BG-11	BG-11*
Biomassa	g L^{-1}	9,000±0,300[a]	7,900±0,300[a]	9,100±0,800[a]	3,000±0,100[b]
Carboidratos	%	17,00±1,00[a]	23,00±1,00[b]	22,30±0,60[b,c]	20,40±0,70[c]
	g	0,38±0,01	0,46±0,03	0,51±0,04	0,15±0,01
Proteínas	%	30,00±2,00[a,c]	17,00±2,00[b]	32,00±2,00[a]	27,00±2,00[c]
	g	0,66±0,04	0,33±0,02	0,71±0,02	0,20±0,02
Lipídeos	%	6,00±3,00[a]	6,60±0,60[a]	4,10±0,40[a]	5,00±2,00[a]
	g	0,13±0,06	0,13±0,01	0,09±0,00	0,03±0,01
Clorofila-a	mg g^{-1}	0,246±0,007[a]	0,127±0,008[b]	1,500±0,300[c]	0,240±0,050[a]
	mg	0,553±0,009	0,250±0,020	3,400±0,600	0,180±0,050
Clorofila-b	mg g^{-1}	0,150±0,007[a]	0,070±0,010[b]	1,100±0,200[c]	0,400±0,100[d]
	mg	0,337±0,005	0,130±0,020	2,500±0,400	0,070±0,080
Carotenoides	mg g^{-1}	0,039±0,005[a]	0,015±0,003[b]	0,05±0,010[a]	0,075±0,009[c]
	mg	0,088±0,008	0,029±0,007	0,120±0,030	0,056±0,008

[a, b, c e d] – notação indica quais dados são estatisticamente significativos

Os gráficos das médias com erro padrão são apresentados na Figura 5.26. Enquanto na Figura 5.26-A pode ser claramente verificada a diferença entre a biomassa final obtida com o meio BG-11*, as respostas das outras variáveis não foram tão facilmente observadas. Esta diferença significativa no crescimento celular utilizando-se o meio BG-11* pode ter ocorrido pela falta de EDTA ou ácido cítrico, cujas concentrações otimizadas foram iguais a zero, por não representarem nutrientes e sim quelante e acidificante, respectivamente. A necessidade de utilização destes compostos deve ser analisada experimentalmente.

A ANOVA realizada para as variáveis resposta estudadas biomassa, carboidratos, proteínas, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides é apresentada na Tabela 5.12, cujos resultados apontam para a existência de diferença em pelo menos um par de médias para todas as variáveis ($p < 0,05$), exceto para os lipídeos. De acordo com a estatística F, como o valor calculado foi muito maior que o tabelado ($F_{(0,95;3;8)}$), existem valores médios que resultam em diferentes variâncias, principalmente para a biomassa, como já foi verificado pela Figura 5.26. Para os lipídeos foi novamente observado que não existem diferenças entre as variâncias geradas pelas médias obtidas em função dos diferentes meios utilizados.

Os testes de homogeneidade foram aplicados às respostas avaliadas em função do meio de cultivo utilizado, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.13. Os testes de Hartley, Cochran e Bartlett indicaram que os dados obtidos em triplicata analítica possuem variância homogênea para as variáveis biomassa, proteínas, carboidratos, lipídeos e carotenoides. O mesmo não ocorreu para os pigmentos clorofila-a e clorofila-b, que foram classificados como não homogêneos por todos os testes aplicados.

Para corrigir este problema, foi aplicada a raiz quadrada aos dados de clorofila-a e clorofila-b e os testes de homogeneidade foram novamente realizados (Tabela 5.14). A partir dos resultados dos testes de Hartley, Cochran e Bartlett utilizando-se os dados corrigidos pode-se verificar que a homogeneidade foi confirmada. Assim, a ANOVA foi novamente realizada, considerando-se os dados corrigidos, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.15. Os resultados da ANOVA indicam que existe diferença em pelo menos um par de variâncias em ambos os conjuntos de dados, já que $p < 0,05$. O mesmo foi verificado pela estatística F, que apresentou valores maiores que o tabelado ($F_{(0,95;3;8)}$), indicando a existência de diferença entre as variâncias das médias.

Assim, os pares de médias estatisticamente diferentes foram determinados para todas as variáveis estudadas, utilizando-se os testes LSD de Fisher, Duncan e Tukey, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.17. Com relação à biomassa, foi verificado que existe diferença significativa entre a concentração obtida utilizando-se o meio BG-11* e todos os outros meios testados, conforme Tukey, Duncan e Fisher. Assim, este meio foi descartado, já que resultou em uma concentração de biomassa significativamente menor que os outros meios. De acordo com todos os testes realizados, os resultados dos meios M-8 e BG-11 não são estatisticamente diferentes. Pelos testes de Fisher e Duncan, há diferença significativa entre os resultados obtidos utilizando-se os meios M-8 e M-8*; BG-11 e M-8*, porém esta diferença não foi confirmada pelo teste de Tukey. Logo, como apenas dois testes indicaram diferença estatística entre estes pares de médias, e aqueles que indicaram apresentaram valores de p muito próximos do nível de confiança, a definição do melhor meio de cultivo para obtenção de biomassa microalgal levou em consideração também a significativa redução na quantidade de nutrientes presentes no meio M-8 otimizado em comparação aos meios originais. Após a análise da composição dos meios (Tabela 5.10) juntamente com os dados estatísticos da comparação entre as médias (Tabela 5.17), foi determinado que o meio M-8* é o mais indicado quando o objetivo for a máxima produção de biomassa.

Com relação aos carboidratos, foi indicado que existe diferença estatística entre os pares de médias obtidas com a utilização dos meios M-8 e M-8*; M-8 e BG-11; M-8 e BG-11*; M-8* e BG-11* pelos testes de Fisher, Duncan e Tukey. Assim, analisando-se os dados apresentados na Tabela 5.11, foi verificado que os melhores meios seriam o M-8* e o BG-11, que não são estatisticamente diferentes, porém não existe diferença significativa entre os meios BG-11 e BG-11*, e existe entre os meios M-8* e BG-11*. Logo, concluiu-se que o meio mais indicado para a produção de carboidratos é o M-8*. Os mesmos resultados foram obtidos considerando-se a quantidade absoluta de carboidratos no meio, que foi igual a 0,46 g utilizando-se o meio M-8*.

Para as proteínas, os testes de Duncan e Tukey indicaram que existe diferença significativa entre os pares de médias obtidos a partir dos meios M-8 e M-8*; M-8* e BG-11; M-8* e BG-11*. Pelo teste de Fisher, além destes pares também há diferença significativa entre os meios BG-11 e BG-11*. Assim, considerando-se os resultados da Tabela 5.11, foi descartado o meio M-8* pois este gerou os menores valores de proteínas nas células, sendo estatisticamente diferente de todos os outros. Pelos resultados dos testes estatísticos foi determinado que, para a obtenção de proteínas, não existe diferença significativa na utilização dos meios M-8, BG-11 e BG-11*, cujas concentrações absolutas de proteínas nos PBRs foram 0,66; 0,71 e 0,20, respectivamente. A pequena quantidade de proteínas no meio BG-11* se deve à baixa concentração de biomassa produzida por este meio. Assim, o meio BG-11 foi o melhor para a produção de proteínas.

Os lipídeos foram produzidos em quantidades muito similares a partir de todos os meios testados, como pode ser claramente verificado na Figura 5.26. De acordo com os testes de Fisher, Duncan e Tukey não existe diferença significativa entre os pares de médias, indicando que nenhum meio pode ser descartado ou apontado como o melhor para a produção de lipídeos. Este resultado vai ao encontro do que foi verificado pela análise de variância ANOVA (Tabela 5.12), que não indicou diferença entre as médias. Por outro lado, considerando-se a quantidade absoluta de lipídeos nos PBRs, foram produzidas 0,13; 0,13; 0,09 e 0,03 g, utilizando-se os meios M-8, M-8*, BG-11 e BG-11*, respectivamente. Logo, os meios M-8 e M-8* foram considerados os melhores para a produção de lipídeos.

Tabela 5.12 – ANOVA aplicada à concentração de *P.malhamensis* e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células

Fator	R	R^2	R^2	Modelo			Residual			F_{calc}	p-valor
	Múltiplo	Múltiplo	Ajustado	SQ	g.l.	MQ	SQ	g.l.	MQ		
Biomassa	0,983682	0,967630	0,955491	75,08270	3	25,02757	2,511732	8	0,313967	79,71412	0,000003
Carboidratos	0,947880	0,898476	0,860404	77,2777	3	25,7592	8,73209	8	1,091511	23,59962	0,000251
Proteínas	0,947227	0,897239	0,858703	394,2910	3	131,4303	45,15837	8	5,644796	23,28345	0,000263
Lipídeos	0,503482	0,253494	-0,026446	12,1100	3	4,0367	35,66241	8	4,457801	0,90553	0,479954
Clorofila-a	0,967174	0,935425	0,911210	3,993232	3	1,331077	0,275662	8	0,034458	38,62919	0,000042
Clorofila-b	0,967780	0,936598	0,912822	2,000237	3	0,666746	0,135404	8	0,016926	39,39288	0,000039
Carotenoides	0,924366	0,854453	0,799873	0,005754	3	0,001918	0,000980	8	0,000123	15,65502	0,001038

$F(0,95;3;8) = 4,07$

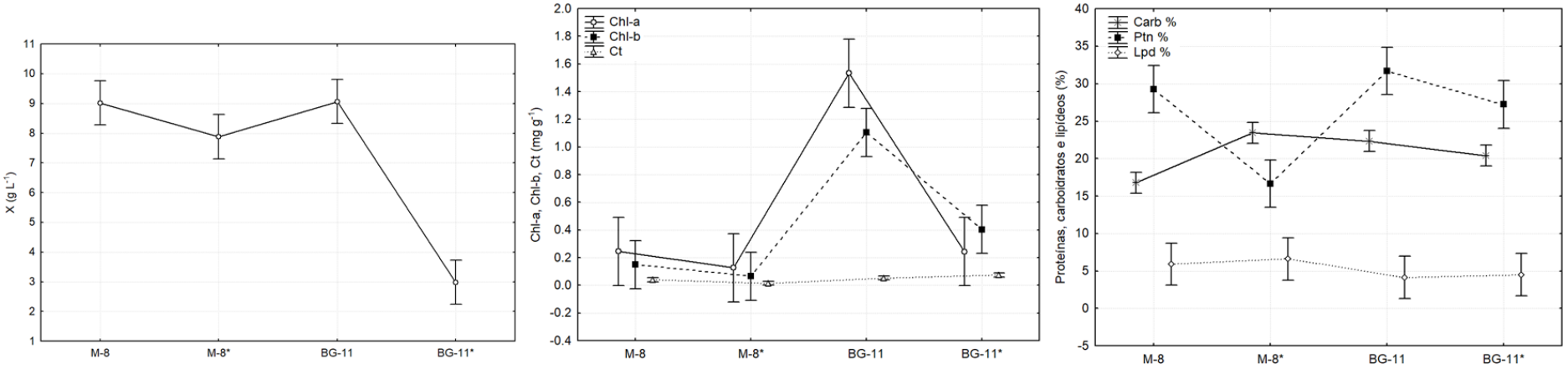

Figura 5.26 – Valores médios com erro padrão da concentração de biomassa e do teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila- e carotenoides em função do meio de cultura utilizado

Tabela 5.13 – Testes de homogeneidade da variância aplicada aos dados de concentração de *P.malhamensis* e componentes celulares

Fator	g.l.	Hartley	Cochran	Bartlett	Distrib. χ^2
		F-max	C	χ^2	p-valor
Biomassa	3	43,92266	0,763499	5,334054	0,148908
Carboidratos	3	3,18146	0,367103	0,797399	0,850089
Proteínas	3	1,89964	0,344218	0,188151	0,979479
Lipídeos	3	41,56701	0,570579	6,061708	0,108646
Clorofila-a	3	**1807,135**	**0,966306**	**20,93073**	**0,000109**
Clorofila-b	3	**795,896**	**0,791634**	**14,66829**	**0,002123**
Carotenoides	3	20,803	0,659208	4,06844	0,254168

$\chi^2(0.95;3) = 7,815$; $C(0,95;6;2) = 0,781$; $F(2;4) = 142$

Tabela 5.14 – Testes de homogeneidade aos dados corrigidos de teor de clorofila-a e clorofila-b

Fator	g.l.	Hartley	Cochran	Bartlett	Distrib. χ^2
		F-max	C	χ^2	p-valor
Clorofila-a	3	63,51273	0,526686	6,455303	0,091442
Clorofila-b	3	30,74231	0,469135	3,489608	0,322112

Tabela 5.15 –ANOVA aos dados corrigidos de teor de clorofila-a e clorofila-b

Fator	r	R^2	R^2	Modelo			Residual			F_{calc}	p-valor
	Múltiplo	Múltiplo	Ajustado	SQ	g.l.	MQ	SQ	g.l.	MQ		
Clorofila-a	0,985595	0,971397	0,960670	1,927910	3	0,642637	0,056769	8	0,007096	90,56223	2.10^{-6}
Clorofila-b	0,985822	0,971844	0,961286	2,525237	3	0,841746	0,073160	8	0,009145	92,04399	2.10^{-6}

Considerando-se o pigmento clorofila-a, os testes de Fisher, Duncan e Tukey apontaram que há diferença estatística entre os pares de médias gerados a partir dos meios M-8 e M-8*; M-8 e BG-11; M-8* e BG-11; M-8* e BG-11*; BG-11 e BG-11*. Assim, pode ser verificado a partir da Tabela 5.11, que o meio que possibilitou a maior produção de clorofila-a foi o BG-11, com valores de 6 a 12 vezes maiores que aqueles obtidos com os outros meios testados. O mesmo foi verificado para o pigmento clorofila-b, cujos pares de médias foram todos considerados estatisticamente diferentes pelos testes de Fisher, Duncan e Tukey. Assim, o meio BG-11 foi classificado como o melhor para produção de pigmentos clorofila-a e clorofila-b. O mesmo resultado foi encontrado pela concentração absoluta de clorofila a e b no meio, cujas quantidades foram 3,448 e 2,488 mg, respectivamente, utilizando-se o meio BG-11.

Com relação aos carotenoides, pelo teste de Tukey foi verificado que há diferença entre os pares de médias gerados pelos meios M-8 e BG-11*; M-8* e BG-11; M-8* e BG-11*. Considerando-se os testes de Fisher e Duncan, além destes há também diferença entre os meios M-8 e M-8*; BG-11 e BG-11*. Assim, conclui-se que o melhor meio para a produção de carotenoides por grama de biomassa é o BG-11*. No entanto, devido à baixa concentração de biomassa produzida por este meio, a quantidade total de carotenoides no PBR foi inferior ao meio BG-11, com valores de 0,056 e 0,121, respectivamente.

Assim, conclui-se que o meio mais indicado para a produção de biomassa, carboidratos e lipídeos foi o M-8*, por apresentar alta produtividade e reduzida quantidade de nutrientes. Já para a produção de proteínas, clorofila-a, clorofila-b e carotenoides, o meio que apresentou maior produtividade no PBR foi o BG-11.

Tabela 5.16 – Testes de normalidade das observações para a concentração de *P.malhamensis* e o teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células

Fator	**g.l.**	**Kolmogorov-Smirnov**		**Lilliefors**	**Shapiro-Wilk**	
		D	**p-valor**	**p-valor**	**W**	**p-valor**
Biomassa	3	0,29067	>0,20	**<0,01**	0,77496	**0,00493**
Carboidratos	3	0,16735	>0,20	>0,20	0,94519	0,56800
Proteínas	3	0,24987	>0,20	**<0,05**	0,88749	0,10938
Lipídeos	3	0,14904	>0,20	>0,20	0,95523	0,71426
Clorofila-a	3	0,34257	<0,10	**<0,01**	0,74337	**0,00228**
Clorofila-b	3	0,21420	>0,20	<0,15	0,89378	0,13183
Carotenoides	3	0,12456	>0,20	>0,20	0,95344	0,68772

D(0,05;12) = 0,3754

Tabela 5.17 – Testes de MDS de Fisher, Duncan e DHS de Tukey para a concentração de *P.malhamensis* e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células em função do meio de cultura

		LSD Fisher				**Duncan**				**Tukey**			
		M-8	**M-8***	**BG-11**	**BG-11***	**M-8**	**M-8***	**BG-11**	**BG-11***	**M-8**	**M-8***	**BG-11**	**BG-11***
Biomassa	M-8		**0,037746**	0,923623	**0,000001**		**0,037901**	0,923764	**0,000100**		0,137139	0,999647	**0,000231**
	M-8*	**0,037746**		**0,032357**	**0,000005**	**0,037901**		**0,038116**	**0,000224**	0,137139		0,119459	**0,000239**
	BG-11	0,923623	**0,032357**		**0,000001**	0,923764	**0,038116**		**0,000077**	0,999647	0,119459		**0,000231**
	BG-11*	**0,000001**	**0,000005**	**0,000001**		**0,000100**	**0,000224**	**0,000077**		**0,000231**	**0,000239**	**0,000231**	
Carboidratos	M-8		**0,000051**	**0,000185**	**0,002730**		**0,000140**	**0,000327**	**0,002889**		**0,000419**	**0,001003**	**0,011796**
	M-8*	**0,000051**		0,223591	**0,007323**	**0,000140**		0,223741	**0,009046**	**0,000419**		0,577178	**0,030149**
	BG-11	**0,000185**	0,223591		0,054741	**0,000327**	0,223741		0,054902	**0,001003**	0,577178		0,190165
	BG-11*	**0,002730**	**0,007323**	0,054741		**0,002889**	**0,009046**	0,054902		**0,011796**	**0,030149**	0,190165	
Proteínas	M-8		**0,000190**	0,244521	0,321541		**0,000333**	0,244671	0,321685		**0,001025**	0,612309	0,723372
	M-8*	**0,000190**		**0,000055**	**0,000621**	**0,000333**		**0,000146**	**0,000793**	**0,001025**		**0,000437**	**0,002902**
	BG-11	0,244521	**0,000055**		**0,049478**	0,244671	**0,000146**		0,057324	0,612309	**0,000437**		0,174139
	BG-11*	0,321541	**0,000621**	**0,049478**		0,321685	**0,000793**	0,057324		0,723372	**0,002902**	0,174139	
Lipídeos	M-8		0,702041	0,332875	0,438924		0,702202	0,351753	0,439122		0,977507	0,737509	0,846181
	M-8*	0,702041		0,191369	0,260418	0,702202		0,216172	0,278844	0,977507		0,518428	0,637514
	BG-11	0,332875	0,191369		0,834324	0,351753	0,216172		0,834457	0,737509	0,518428		0,996194
	BG-11*	0,438924	0,260418	0,834324		0,439122	0,278844	0,834457		0,846181	0,637514	0,996194	
Clorofila-a	M-8		**0,003098**	**0,000003**	0,852421		**0,003935**	**0,000223**	0,852549		**0,013302**	**0,000234**	0,997339
	M-8*	**0,003098**		**0,000000**	**0,004041**	**0,003935**		**0,000077**	**0,004204**	**0,013302**		**0,000231**	**0,017148**
	BG-11	**0,000003**	**0,000000**		**0,000003**	**0,000223**	**0,000077**		**0,000101**	**0,000234**	**0,000231**		**0,000234**
	BG-11*	0,852421	**0,004041**	**0,000003**		0,852549	**0,004204**	**0,000101**		0,997339	**0,017148**	**0,000234**	
Clorofila-b	M-8		**0,001585**	**0,000004**	**0,000672**		**0,001740**	**0,000102**	**0,000843**		**0,007018**	**0,000236**	**0,003123**
	M-8*	**0,001585**		**0,000000**	**0,000008**	**0,001740**		**0,000077**	**0,000105**	**0,007018**		**0,000231**	**0,000248**
	BG-11	**0,000004**	**0,000000**		**0,000473**	**0,000102**	**0,000077**		**0,000650**	**0,000236**	**0,000231**		**0,002265**
	BG-11*	**0,000672**	**0,000008**	**0,000473**		**0,000843**	**0,000105**	**0,000650**		**0,003123**	**0,000248**	**0,002265**	
Carotenoides	M-8		**0,026734**	0,150944	**0,004212**		**0,026903**	0,151136	**0,005291**		0,100505	0,435853	**0,017837**
	M-8*	**0,026734**		**0,002629**	**0,000159**	**0,026903**		**0,003360**	**0,000297**	0,100505		**0,011381**	**0,000890**
	BG-11	0,150944	**0,002629**		**0,045529**	0,151136	**0,003360**		**0,045683**	0,435853	**0,011381**		0,161893
	BG-11*	**0,004212**	**0,000159**	**0,045529**		**0,005291**	**0,000297**	**0,045683**		**0,017837**	**0,000890**	0,161893	

5.2.2.4 Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento e a composição centesimal das células

Considerando-se que o nitrogênio é o elemento do meio presente em maior quantidade nas células, foi avaliada a influência da fonte utilizada para este nutriente sobre o crescimento da biomassa (Figura 5.27) e o teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos (clorofila a, clorofila b e carotenoides). Foi verificado que, exceto para o nitrato de amônio, as concentrações finais atingidas nas culturas foram próximas àquela calculada no preparo do meio. Similar ao cultivo de avaliação dos meios, a fase estacionária foi alcançada em aproximadamente 200 h. Na Tabela 5.18, são apresentados os valores médios com erro padrão para as variáveis de resposta, em valores proporcionais e absolutos.

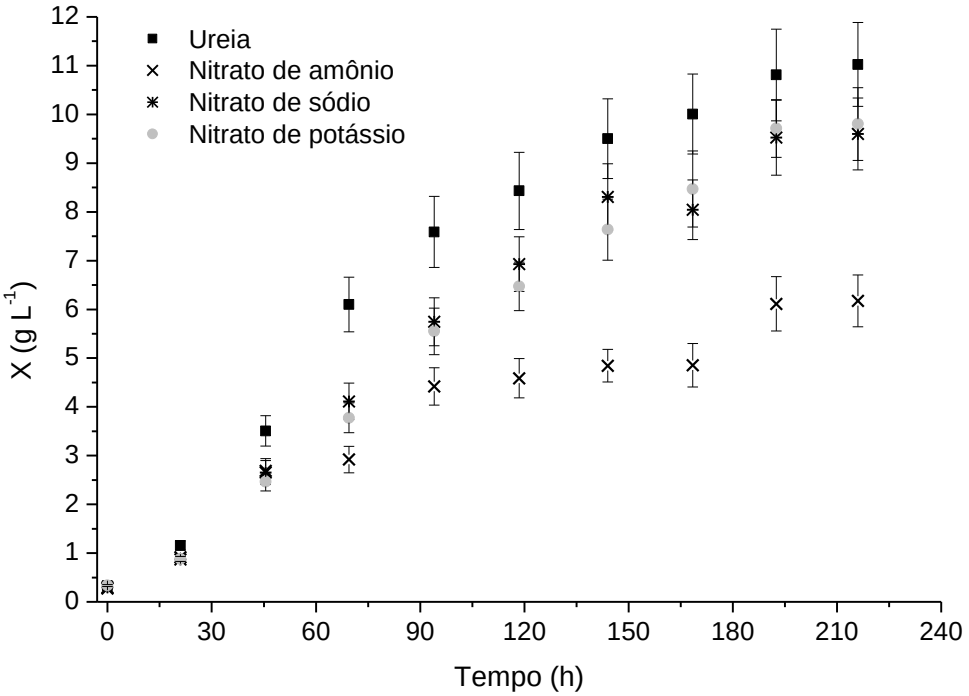

Figura 5.27 – Perfil de crescimento da microalga *P. malhamensis* utilizando-se diferentes fontes de nitrogênio

Os gráficos das médias com erro padrão são apresentados na Figura 5.27. A ANOVA realizada para as variáveis resposta estudadas biomassa, carboidratos, proteínas, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides é apresentada na Tabela 5.19, cujos resultados apontam para a existência de diferença em pelo menos um par de médias para todas as variáveis ($p < 0,05$), exceto para os lipídeos e carotenoides. De acordo com a estatística F, como o valor calculado foi muito maior que o tabelado ($F_{(0,95;3;8)}$), existem

valores médios que resultam em diferentes variâncias. Para os lipídeos e carotenoides foi novamente observado que não existem diferenças entre as variâncias geradas pelas médias obtidas em função dos diferentes meios utilizados.

Tabela 5.18 – Concentração de biomassa e teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos da microalga *P. malhamensis* em função da fonte de nitrogênio

	Unidade	Ureia	NH_4NO_3	$NaNO_3$	KNO_3
Biomassa	g L^{-1}	11,100±0,600[a]	6,500±0,400[b]	9,500±0,600[a,b]	10,200±0,900[a,b]
Carboidratos	%	41,10±0,80[a]	17,00±2,00[a]	31,30±0,9,00 [a]	24,00±2,00 [a]
	g	1,13±0,04	0,28±0,01	0,75±0,06	0,60±0,01
Proteínas	%	14,00±1,00[a]	30,05±1,15[b]	15,63±1,72[a]	12,96±1,89[a]
	g	0,39±0,05	0,49±0,05	0,37±0,05	0,33±0,08
Lipídeos	%	6,88±3,07[a]	4,96±0,89[a]	4,89±0,42[a]	2,61±1,31[a]
	g	0,19±0,08	0,08±0,02	0,12±0,01	0,07±0,03
Clorofila-a	mg g^{-1}	0,615±0,058[a]	2,549±0,109[b]	0,987±0,202[c]	0,649±0,039[a]
	mg	1,710±0,250	4,200±0,400	2,330±0,370	1,660±0,210
Clorofila-b	mg g^{-1}	0,276±0,034[a]	1,538±0,091[b]	0,459±0,114[c]	0,310±0,024[a,c]
	mg	0,760±0,050	2,520±0,190	1,080±0,230	0,790±0,120
Carotenoides	mg g^{-1}	0,086±0,007[a,b]	0,135±0,024[a]	0,099±0,039[a,b]	0,063±0,004[b]
	mg	0,240±0,020	0,220±0,050	0,230±0,090	0,160±0,020

[a, b, c e d] – notação indica quais dados são estatisticamente significativos

Os testes de Hartley, Cochran e Bartlett foram aplicados às respostas avaliadas em função da fonte de nitrogênio utilizada para verificar a suposição de homogeneidade dos dados. Como pode ser verificado pela Tabela 5.20, os resultados de todas as variáveis estudadas foram consideradas homogêneas por todos os testes aplicados, com exceção dos carotenoides por Bartlett. Embora os dados de carotenoides foram considerados como não homogêneos, apenas um dos três testes apresentou este resultado desfavorável e o valor de χ^2 ficou muito próximo do tabelado. Assim, todos os dados foram considerados homogêneos.

Tabela 5.19 – ANOVA aplicada à concentração de *P.malhamensis* e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células

Fator	r	R^2	R^2	Modelo			Residual			F_{calc}	p-valor
	Múltiplo	Múltiplo	Ajustado	SQ	g.l.	MQ	SQ	g.l.	MQ		
Biomassa	0,930973	0,866711	0,816728	34,35	3	11,451	5,28287	8	0,660358	17,3400	0,000734
Carboidratos	0,987806	0,975761	0,966672	951,5925	3	317,1975	23,63819	8	2,954774	107,3508	0,000001
Proteínas	0,976436	0,953427	0,935963	571,11	3	190,371	27,89756	8	3,487195	54,5915	0,000011
Lipídeos	**0,729024**	**0,531476**	**0,355779**	**27,51**	**3**	**9,169**	**24,24804**	**8**	**3,031005**	**3,0250**	**0,093596**
Clorofila-a	0,988704	0,977535	0,969111	7,53	3	2,510	0,17302	8	0,021627	116,0365	0,000001
Clorofila-b	0,989527	0,979164	0,971351	3,24	3	1,081	0,06899	8	0,008624	125,3190	0,000000
Carotenoides	**0,746269**	**0,556917**	**0,390761**	**0,01**	**3**	**0,003**	**0,00644**	**8**	**0,000805**	**3,3518**	**0,076094**

$F(0,95;3;8) = 4,07$

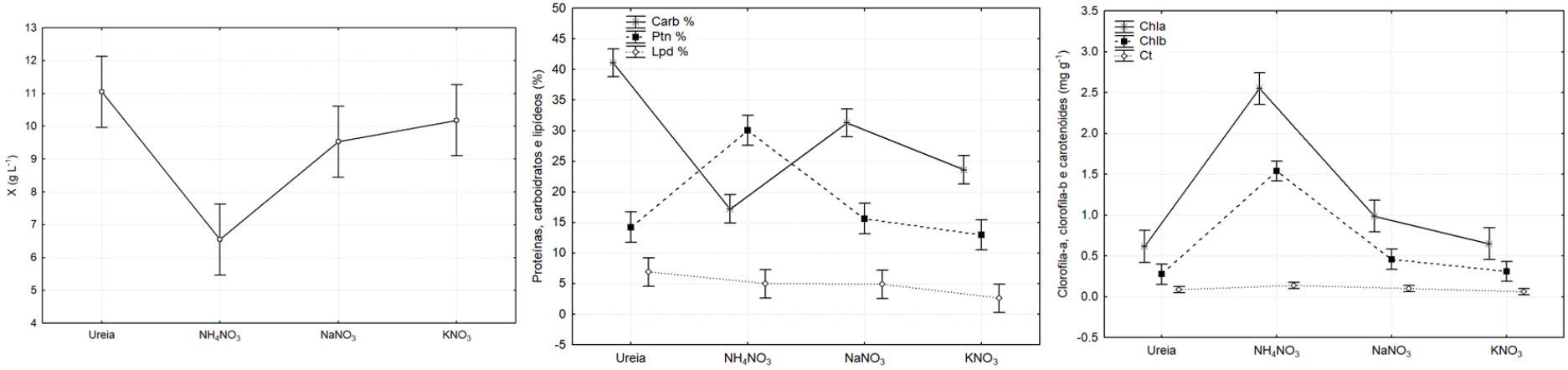

Figura 5.28 – Valores médios com erro padrão da concentração de biomassa e do teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila- e carotenoides em função do meio de cultura utilizado

Tabela 5.20 – Testes de homogeneidade das variâncias aplicada à concentração de *P.malhamensis* e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células

Fator	g.l.	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett χ^2	Distrib. χ^2 p-valor
Biomassa	3	4,33641	0,480194	0,965817	0,809522
Carboidratos	3	5,21494	0,449249	1,742371	0,627555
Proteínas	3	2,71767	0,385339	0,612842	0,893486
Lipídeos	3	53,53808	0,778043	5,976634	0,112753
Clorofila-a	3	27,12757	0,710444	4,748778	0,191145
Clorofila-b	3	22,90666	0,564097	4,568971	0,206220
Carotenoides	3	85,39954	0,705099	**7,978906**	0,046450

$\chi^2(0.95;3) = 7,815$; $C(0,95;6;2) = 0,781$; $F(2;4) = 142$

Para verificar o pressuposto de normalidade dos dados obtidos, foram aplicados os testes de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors e Shapiro-Wilk, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.21. Pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors, os dados de todas as variáveis estudadas são normais. Por outro lado, considerando-se o teste de Shapiro-Wilk, os dados dos três pigmentos estudados não foram considerados normais. Como apenas um dos três testes utilizados apontou uma falta de normalidade nos dados, estes foram considerados normais e foram utilizados para a análise de variância.

Tabela 5.21 – Testes de normalidade das observações para a concentração de *P.malhamensis* e o teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células

Fator	g.l.	Kolmogorov-Smirnov		Lilliefors	Shapiro-Wilk	
		D	p-valor	p-valor	W	p-valor
Biomassa	3	0,17506	>0,20	>0,20	0,91650	0,25825
Carboidratos	3	0,14685	>0,20	>0,20	0,93494	0,43539
Proteínas	3	0,30393	<0,20	<0,10	0,78175	0,0585
Lipídeos	3	0,16422	>0,20	>0,20	0,92979	0,37792
Clorofila-a	3	0,31027	<0,20	<0,10	0,72310	**0,00142**
Clorofila-b	3	0,34147	<0,10	<0,10	0,34147	**0,00071**
Carotenoides	3	0,21791	>0,20	<0,15	0,85643	**0,04411**

$D(0,05;12) = 0,3754$

Assim, os pares de médias estatisticamente diferentes foram determinados para todas as variáveis estudadas, utilizando-se os testes LSD de Fisher, Duncan e Tukey, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.22. Com relação à biomassa, foi verificado que existe diferença significativa entre a concentração obtida utilizando-se as fontes ureia e NH_4NO_3; NH_4NO_3 e $NaNO_3$; NH_4NO_3 e KNO_3, conforme Tukey, Duncan e Fisher. Assim,

o NH_4NO_3 foi descartado por produzir uma concentração significativamente menor de biomassa quando comparado às outras fontes de N. Isso pode ter ocorrido devido à evaporação da amônia inorgânica, que representa 50% do N do NH_4NO_3, já que a produção de biomassa foi de aproximadamente 50% da produção obtida com as outras fontes (ver Figura 5.27). Logo, analisando-se a Tabela 5.18 juntamente com a Tabela 5.22, conclui-se que as melhores fontes de nitrogênio para a obtenção da biomassa são a ureia, $NaNO_3$ e KNO_3, sem diferença estatística entre elas. Neste caso, alguns fatores externos devem ser levados em consideração na escolha da melhor fonte de N, como por exemplo, o custo dos compostos. Foi verificado que o custo da ureia, o KNO_3 e o $NaNO_3$, vendidos pela Sigma-Aldrich, é de US$ 39,20, 106,00 e 82,00, respectivamente. Além disso, o KNO_3 é controlado pelo Exército Brasileiro, de acordo com o Decreto n° 3665 de 20 de novembro de 2000, o que dificulta a sua aquisição, principalmente em larga escala. Assim, devido ao menor custo e à facilidade de compra, a fonte de nitrogênio com o melhor custo-benefício foi a ureia.

Com relação aos carboidratos, foi indicado que existe diferença estatística entre os pares de médias obtidos com a utilização das quatro fontes de nitrogênio avaliadas. Com isso, concluiu-se que a ureia é a fonte que proporciona um maior acúmulo de carboidratos nas células (ver Tabela 5.18). O mesmo resultado foi verificado considerando-se a quantidade absoluta de carboidratos no meio, que foi de 1,13 g utilizando-se a ureia como fonte de N.

Para as proteínas, os testes de Fisher, Duncan e Tukey indicaram que existe diferença significativa entre os pares de médias obtidos a partir das fontes ureia e NH_4NO_3; NH_4NO_3 e $NaNO_3$; NH_4NO_3 e KNO_3. Assim, pela Tabela 5.18 foi concluído que a melhor fonte de nitrogênio para a obtenção de proteínas é o NH_4NO_3, cujos resultados foram estatisticamente diferentes de todos os outros. O mesmo resultado foi verificado considerando-se a quantidade absoluta de proteínas no PBR, que foi de 0,49 g utilizando-se o NH_4NO_3 como fonte de N.

De acordo com os testes de Fisher, Duncan e Tukey para os lipídeos, existe diferença significativa entre o par de médias gerado pelas fontes ureia e KNO_3 (ver Tabela 5.22). Assim, analisando-se os resultados da Tabela 5.18, conclui-se que as melhores fontes para a produção de lipídeos são a ureia, NH_4NO_3 e $NaNO_3$, sem diferença estatística entre elas. Por outro lado, considerando-se a quantidade absoluta de lipídeos no PBR, os valores obtidos foram de 0,19; 0,08 e 0,12 utilizando-se as fontes ureia, NH_4NO_3 e $NaNO_3$. Assim, a fonte de N que produziu a maior quantidade de lipídeos no PBR foi a ureia.

Considerando-se o pigmento clorofila-a, o teste de Fisher apontou que há diferença estatística entre os pares de médias gerados a partir das fontes ureia e NH_4NO_3; NH_4NO_3 e $NaNO_3$; NH_4NO_3 e KNO_3. Pelos testes de Fisher e Duncan, além destes há diferença entre os pares gerados pelas fontes ureia e $NaNO_3$; $NaNO_3$ e KNO_3. Assim, a partir dos dados da Tabela 5.18, concluiu-se que a melhor fonte de nitrogênio para a produção de clorofila-a é o NH_4NO_3, com valores estatisticamente diferentes de todas as outras fontes. O mesmo resultado foi verificado considerando-se a quantidade absoluta de clorofila-a no PBR, que foi de 4,18 mg, utilizando-se o NH_4NO_3 como fonte de N.

Para o pigmento clorofila-b, o teste de Fisher indicou diferença significativa nos pares de médias gerados pelas fontes ureia e NH_4NO_3; NH_4NO_3 e $NaNO_3$; NH_4NO_3 e KNO_3. Já pelos testes de Fisher e Duncan, além destes há diferença entre o par de médias gerado pelas fontes ureia e $NaNO_3$. Assim, concluiu-se que a melhor fonte de nitrogênio para a produção de clorofila-b é o NH_4NO_3, com valores estatisticamente diferentes de todas as outras fontes. O mesmo resultado foi verificado considerando-se a quantidade absoluta de clorofila-b no PBR, que foi de 2,52 mg utilizando-se o NH_4NO_3 como fonte de N.

Com relação aos carotenoides, pelos testes de Fisher e Duncan há diferença estatística entre o par de médias gerado pelas fontes NH_4NO_3 e KNO_3. Já pelo teste de Tukey foi verificado que não há diferença entre os pares de médias gerados pelas fontes estudadas, concordando com o resultado da análise de variância. Assim, concluiu-se que as melhores fontes de nitrogênio para a obtenção de carotenoides são a ureia, NH_4NO_3 e $NaNO_3$, sem diferença estatística entre elas. Da mesma forma, considerando-se a quantidade absoluta de carotenoides produzida no PBR, foram encontrados valores de 0,24; 0,22 e 0,23 mg, utilizando-se ureia, NH_4NO_3 e $NaNO_3$, respectivamente, não sendo possível definir apenas uma fonte como a melhor. Neste caso, novamente deve-se considerar o valor de compra dos compostos, sendo verificado que o custo da ureia, o NH_4NO_3 e o $NaNO_3$, vendidos pela Sigma Aldrich, é de US$ 39,20; 99,50 e 82,00 kg^{-1}. Além disso, o nitrato de amônio é controlado pelo Exército Brasileiro de acordo com o Decreto n° 3665, de 20 de novembro de 2000. Sendo assim, a fonte que apresentou o melhor custo-benefício para a produção de carotenoides foi a ureia.

A partir dos resultados obtidos, foi verificado que a utilização da ureia como fonte de N foi o mais indicado para a produção de biomassa, carboidratos, lipídeos e carotenoides. Por outro lado, quando o interesse é a produção de proteínas, clorofila-a e clorofila-b, a fonte de N mais indicada foi o NH_4NO_3.

Tabela 5.22 – Testes de MDS de Fisher, Duncan e DHS de Tukey para a concentração de *P.malhamensis* e ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos das células em função da fonte de nitrogênio

		LSD Fisher				**Duncan**				**Tukey**			
		Ureia	**NH_4NO_3**	**$NaNO_3$**	**KNO_3**	**Ureia**	**NH_4NO_3**	**$NaNO_3$**	**KNO_3**	**Ureia**	**NH_4NO_3**	**$NaNO_3$**	**KNO_3**
Biomassa	**Ureia**		**0,000140**	0,051599	0,226166		**0,000270**	0,059682	0,226315		**0,000811**	0,180641	0,581623
	NH_4NO_3	**0,000140**		**0,002012**	**0,000594**	**0,000270**		**0,002162**	**0,000830**	**0,000811**		**0,008812**	**0,002787**
	$NaNO_3$	0,051599	**0,002012**		0,358293	0,059682	**0,002162**		0,358472	0,180641	**0,008812**		0,767324
	KNO_3	0,226166	**0,000594**	0,358293		0,226315	**0,000830**	0,358472		0,581623	**0,002787**	0,767324	
Carboidratos	**Ureia**		**0,000000**	**0,000118**	**0,000002**		**0,000077**	**0,000311**	**0,000101**		**0,000231**	**0,000714**	**0,000232**
	NH_4NO_3	**0,000000**		**0,000008**	**0,001855**	**0,000077**		**0,000105**	**0,002006**	**0,000231**		**0,000248**	**0,008153**
	$NaNO_3$	**0,000118**	**0,000008**		**0,000582**	**0,000311**	**0,000105**		**0,000755**	**0,000714**	**0,000248**		**0,002734**
	KNO_3	**0,000002**	**0,001855**	**0,000582**		**0,000101**	**0,002006**	**0,000755**		**0,000232**	**0,008153**	**0,002734**	
Proteínas	**Ureia**		**0,000006**	0,378203	0,439651		**0,000103**	0,378383	0,439849		**0,000242**	0,788941	0,846791
	NH_4NO_3	**0,000006**		**0,000013**	**0,000004**	**0,000103**		**0,000227**	**0,000078**	**0,000242**		**0,000263**	**0,000235**
	$NaNO_3$	0,378203	**0,000013**		0,118956	0,378383	**0,000227**		0,132564	0,788941	**0,000263**		0,362748
	KNO_3	0,439651	**0,000004**	0,118956		0,439849	**0,000078**	0,132564		0,846791	**0,000235**	0,362748	
Lipídeos	**Ureia**		0,213502	0,198032	**0,016897**		0,213657	0,215100	**0,022493**		0,559399	0,531056	0,065971
	NH_4NO_3	0,213502		0,959708	0,136472	0,213657		0,959842	0,151057	0,559399		0,999948	0,403691
	$NaNO_3$	0,198032	0,959708		0,147578	0,215100	0,959842		0,147773	0,531056	0,999948		0,428505
	KNO_3	**0,016897**	0,136472	0,147578		**0,022493**	0,151057	0,147773		0,065971	0,403691	0,428505	
Clorofila-a	**Ureia**		**0,000000**	**0,014751**	0,785525		**0,000077**	**0,017844**	0,785675		**0,000231**	0,058161	0,991679
	NH_4NO_3	**0,000000**		**0,000001**	**0,000000**	**0,000077**		**0,000223**	**0,000100**	**0,000231**		**0,000231**	**0,000231**
	$NaNO_3$	**0,014751**	**0,000001**		**0,022676**	**0,017844**	**0,000223**		**0,022852**	0,058161	**0,000231**		0,086490
	KNO_3	0,785525	**0,000000**	**0,022676**		0,785675	**0,000100**	**0,022852**		0,991679	**0,000231**	0,086490	
Clorofila-b	**Ureia**		**0,000000**	**0,042796**	0,668644		**0,000077**	**0,049873**	0,668806		**0,000231**	0,153294	0,968984
	NH_4NO_3	**0,000000**		**0,000001**	**0,000000**	**0,000077**		**0,000223**	**0,000100**	**0,000231**		**0,000231**	**0,000231**
	$NaNO_3$	**0,042796**	**0,000001**		0,085467	**0,049873**	**0,000223**		0,085619	0,153294	**0,000231**		0,277641
	KNO_3	0,668644	**0,000000**	0,085467		0,668806	**0,000100**	0,085619		0,968984	**0,000231**	0,277641	
Carotenoides	**Ureia**		0,066069	0,576881	0,363979		0,075626	0,577044	0,364156		0,223554	0,934943	0,773654
	NH_4NO_3	0,066069		0,160747	**0,014894**	0,075626		0,160931	**0,019957**	0,223554		0,456902	0,058685
	$NaNO_3$	0,576881	0,160747		0,161150	0,577044	0,160931		0,176890	0,934943	0,456902		0,457750
	KNO_3	0,363979	**0,014894**	0,161150		0,364156	**0,019957**	0,176890		0,773654	0,058685	0,457750	

5.2.2.5 Considerações finais – Nível II

A partir do estudo do segundo nível hierárquico, foi possível identificar o comportamento da cepa utilizada frente aos parâmetros operacionais e condições do sistema, bem como propor meios otimizados especificamente para esta microalga. Além disso, foram determinados o melhor meio e a melhor fonte de nitrogênio para a produção de biomassa, lipídeos, carboidratos, proteínas e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides.

Pelo estudo da tolerância da cepa, foi verificado que esta respondeu melhor à temperaturas acima de 30 °C, metabolizou carbono orgânico, não sofreu com a tensão de cisalhamento na faixa estudada, não sofreu inibição pela concentração de CO_2 utilizada, e respondeu melhor à maiores intensidades luminosas, principalmente em altas concentrações celulares.

Pelo estudo dos meios M-8 e BG-11 originais e otimizados (M-8* e BG-11*), observou-se que o mais indicado para a produção de biomassa, carboidratos e lipídeos foi o M-8*, por apresentar alta produtividade e reduzida quantidade de nutrientes. Já para a produção de proteínas, clorofila-a, clorofila-b e carotenoides, o meio que apresentou maior produtividade no PBR foi o BG-11.

Pela avaliação de diferentes fontes de nitrogênio, concluiu-se que a utilização da ureia foi mais indicada para a produção de biomassa, carboidratos, lipídeos e carotenoides. Por outro lado, quando o interesse é a produção de proteínas, clorofila-a e clorofila-b, a fonte de N mais indicada foi o NH_4NO_3.

5.2.3 Terceiro nível hierárquico – Modelagem matemática do processo

5.2.3.1 Cinética de crescimento de *P. malhamensis* em cultivo descontínuo

A variação da concentração da biomassa em função do tempo (Equação 5.11) foi escrita com base na taxa de velocidade específica de transformação, levando-se em consideração a taxa específica de crescimento total (Equação 5.12) na forma multiplicativa, conforme apresentado na Equação 2.45, e um termo de morte celular – k_d.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{total} - k_d)X \tag{5.11}$$

$$\mu_{total} = \mu_{max} . \mu_T . \mu_{pH} . \mu_{CIT} . \mu_{OD} . \mu_{I_{av}} \quad (5.12)$$

Considerando-se as equações de dissociação do CO_2 em água (Equações 2.8 a 2.10), tem-se três formas de carbono inorgânico presentes no meio, sendo elas o CO_2, HCO_3^- e CO_3^{2-}. Assim, tem-se a Equação 5.13, que representa a concentração de carbono inorgânico total (CIT) na fase líquida.

$$[CIT] = CO_2 + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] \quad (5.13)$$

Partindo-se da Equação 5.13 e admitindo-se as definições de velocidade específica de transformação, foram determinadas as Equações 5.14 a 5.16, que descrevem a variação na concentração de todas as espécies de carbono inorgânico dissolvidas no meio em função do pH.

$$\frac{dCO_2}{dt} = (kb_1[H^+] + kb_3)[HCO_3^-] - \left(kf_1 + \frac{kf_3 K_w}{[H^+]}\right) CO_2 \quad (5.14)$$

$$\frac{d[HCO_3^-]}{dt} = \left(kf_1 + \frac{kf_3 K_w}{[H^+]}\right) CO_2 + kb_2[CO_3^{2-}][H^+] - (kb_3 + kf_2 + kb_1[H^+])[HCO_3^-] \quad (5.15)$$

$$\frac{d[CO_3^{2-}]}{dt} = kf_2[HCO_3^{2-}] - kb_2[CO_3^{2-}][H^+] \quad (5.16)$$

Admitindo-se que as microalgas utilizam o CO_2 como fonte de carbono para o metabolismo celular – fotossíntese (Figura 2.1), e levando-se em consideração as definições de conversão e de velocidade específica de transformação, foi proposta a Equação 5.17, que representa a taxa de consumo de CO_2 (R_{xCO_2}) pelas células.

$$R_{xCO_2} = \mu_{Total}\, X\, Y_{CO_2/X} \quad (5.17)$$

Considerando-se as Equações 5.13 a 5.17 foi proposta a Equação 5.18, que representa a variação na concentração de carbono inorgânico total (CIT).

$$\frac{dCIT}{dt} = \frac{dCO_2}{dt} + \frac{d[HCO_3^-]}{dt} + \frac{d[CO_3^{2-}]}{dt} - R_{xCO_2} \quad (5.18)$$

Como existem diversas espécies dissolvidas no meio, o balanço de eletro-neutralidade foi proposto, sendo apresentado na Equação 5.19.

$$[H^+] + [Cat^+] = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [An^-] \quad (5.19)$$

Sendo $[Cat^+]$ e $[An^-]$ concentração de cátions e ânions, respectivamente.

O balanço para a concentração de H^+ (Equação 5.20) foi construído a partir de todo o conhecimento sobre a especiação do CO_2 e do balanço de eletro neutralidade.

$$\frac{d[H^+]}{dt} = \frac{\left(\frac{K_1}{[H^+]} + \frac{2\,K_1\,K_2}{[H^+]^2}\right)\frac{dCIT}{dt}}{1 + \frac{K_w}{[H^+]^2} + \frac{K_1 CIT}{[H^+]^2} + \frac{8\,K_1\,K_2\,CIT}{[H^+]^3}} \quad (5.20)$$

Tomando-se o esquema apresentado na Figura 2.1, tem-se o O_2 como subproduto da reação de fotossíntese. Assim, considerando-se a definição de conversão, foi proposta a Equação 5.21, que representa a produção de O_2 a partir da biomassa de microalgas.

$$R_{xOD} = \mu_{Total}\, X\, Y_{O_2/X} \tag{5.21}$$

Para construir o balanço de massa para o OD, apresentado na Equação 5.22, foi considerada a Equação 5.21.

$$\frac{dOD}{dt} = R_{xOD} \tag{5.22}$$

5.2.4 Quarto nível hierárquico – Modelo simplificado

5.2.4.1 Formulação do modelo simplificado

Para compor o modelo simplificado do processo de cultivo de microalgas em PBR foram consideradas as equações de transferência de massa (Equações 5.1 a 5.4) acopladas às equações desenvolvidas no terceiro nível hierárquico. O sistema de equações gerado, apresentado nas Equações 5.23 a 5.30, é composto por uma equação para a biomassa, quatro para a concentração das espécies de carbono inorgânico dissolvidas, uma para a concentração de íons $[H^+]$, uma para a concentração de OD e duas para as concentrações de O_2 e CO_2 na fase gasosa. A lei de Henry, apresentada na Equação 2.29 foi utilizada para relacionar as fases líquida e gasosa (Equação 5.32).

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{total} - k_d)X \tag{5.23}$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = K_L a_{CO_2}\left(CO_2^{eq} - CO_2\right) + (kb_1[H^+] + kb_3)[HCO_3^-] - \left(kf_1 + \frac{kf_3 K_w}{[H^+]}\right)CO_2 \tag{5.24}$$

$$\frac{d[HCO_3^-]}{dt} = \left(kf_1 + \frac{kf_3 K_w}{[H^+]}\right)CO_2 + kb_2[CO_3^{2-}][H^+] - (kb_3 + kf_2 + kb_1[H^+])[HCO_3^-] \tag{5.25}$$

$$\frac{d[CO_3^{2-}]}{dt} = kf_2[HCO_3^{2-}] - kb_2[CO_3^{2-}][H^+] \tag{5.26}$$

$$\frac{dCIT}{dt} = \frac{dCO_2}{dt} + \frac{d[HCO_3^-]}{dt} + \frac{d[CO_3^{2-}]}{dt} - \mu_{Total}\, X\, Y_{CO_2/X} \tag{5.27}$$

$$\frac{d[H^+]}{dt} = \frac{\left(\frac{K_1}{[H^+]} + \frac{2\,K_1\,K_2}{[H^+]^2}\right)\frac{dCIT}{dt}}{1 + \frac{K_w}{[H^+]^2} + \frac{K_1 CIT}{[H^+]^2} + \frac{8\,K_1\,K_2\,CIT}{[H^+]^3}} \tag{5.28}$$

$$\frac{dOD}{dt} = K_L a_{O_2}\left(O_2^{eq} - OD\right) + \mu_{Total}\, X\, Y_{O_2/X} \tag{5.29}$$

$$\frac{dyO_2}{dt} = -K_L a_{O_2}\left(O_2^{eq} - OD\right) \tag{5.30}$$

$$\frac{dyCO_2}{dt} = -K_L a_{CO_2}\left(CO_2^{eq} - CO_2\right) \tag{5.31}$$

$$CO_2^{eq} = K_{HCO2}\phi_{CO2}P \tag{5.32}$$

5.2.4.2 Estimação de parâmetros

A estimação dos parâmetros cinéticos e estequiométricos do modelo proposto foi realizada utilizando-se um algoritmo baseado nos Algoritmos Genéticos, implementado no *software* Maple®. Como critério de minimização foi utilizada a função dos mínimos quadrados (Equação 4.8), e o conjunto de EDOs foi resolvido pelo método de Adams utilizando o pacote lsode[backfull], baseado nas formas de diferenciação atrasada. Os dados experimentais utilizados no procedimento de estimação foram obtidos no PBR_2 em sistema fechado, com concentração inicial de CO_2 na corrente de entrada de 20%, cujos resultados estão apresentados na Figura 5.29.

O perfil de biomassa mostra o crescimento até aproximadamente 4 g L^{-1} em 150 h, fornecendo uma produtividade de 0,027 g L^{-1} h^{-1}. A partir do ponto de exaustão do CO_2 na fase gasosa (~ 110 h), a taxa de crescimento reduziu até cessar (~ 150 h), e o pH aumentou gradualmente. A temperatura foi mantida em 32 ± 0,5 °C durante todo o cultivo e o pH manteve-se constante em aproximadamente 6,9 com o uso do bicarbonato, aumentando até 8,8 após a exaustão do CO_2.

Foi avaliado um modelo cinético que compreendeu 5 equações (Tabela 4.7) para descrever a taxa de crescimento da biomassa em função da temperatura (μ_T), pH (μ_{pH}), concentração de carbono inorgânico dissolvido (μ_{CIT}), concentração de OD (μ_{OD}) e intensidade luminosa média (μ_{Iav}). As condições iniciais e dados do processo utilizados no algoritmo de estimação de parâmetros são apresentados na Tabela 5.23. A concentração inicial de O_2 na fase gasosa (yO_{2in}) foi estimada, e as concentrações iniciais das espécies de carbono inorgânico e oxigênio dissolvidas foram calculadas como função de parâmetros estimados (ver Tabela 5.23).

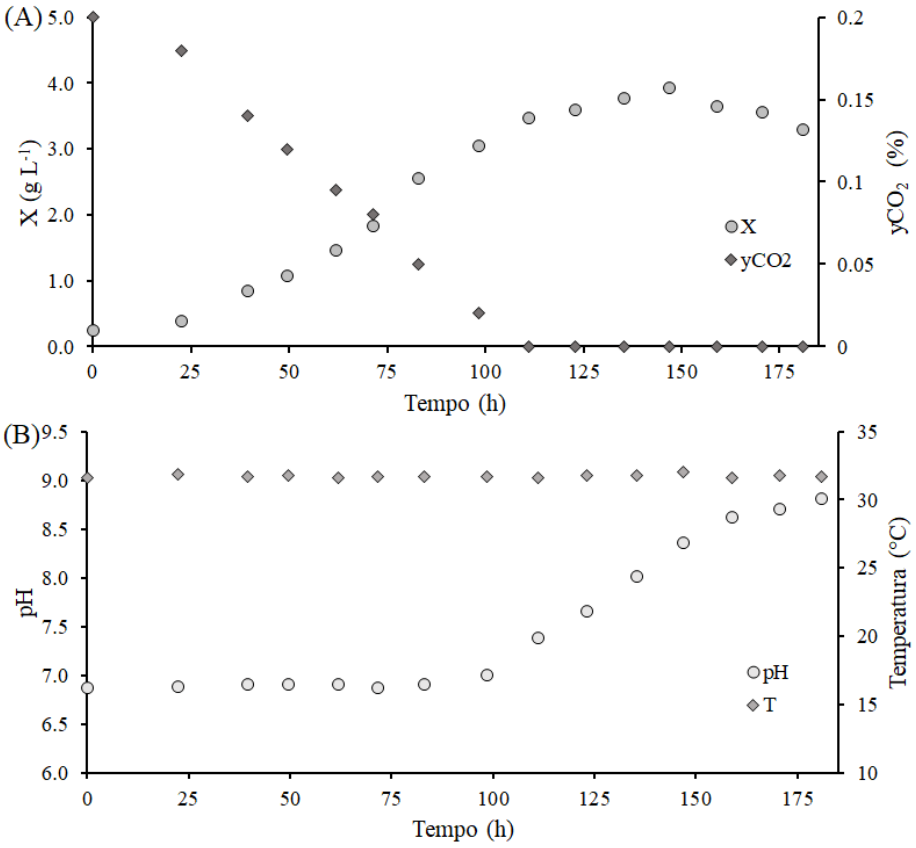

Figura 5.29 – Perfis do cultivo de *Poterioochromonas malhamensis* em sistema fechado

Tabela 5.23 – Dados de entrada do procedimento de estimação de parâmetros

Parâmetro	Unidade	Valor
Condições iniciais		
X_{in}	g L^{-1}	0,238
yCO_{2in}	%	20
yO_{2in}	%	yO_{2in}
$[H^+]_{in}$	mol L^{-1}	$10^{-6,87}$
CO_{2in}	mol L^{-1}	ηCO_2^{eq}
$[HCO_3^-]_{in}$	mol L^{-1}	$\frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2} CO_{2in}$
$[CO_3^{2-}]_{in}$	mol L^{-1}	$\frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2} CO_{2in}$
OD_{in}	mol L^{-1}	φO_2^{eq}
Parâmetros do processo		
p	atm	1
I_{0light}	µmol m^{-2} s^{-1}	300
T	°C	32
K_W	mol^2 L^{-2}	$10^{-\left(\frac{5839,5}{T} - 22,4773 \log(T) + 61,2062\right)}$
K_{HO2}	atm L mol^{-1}	769,23

Os valores encontrados para os parâmetros estimados pelo algoritmo genético e os parâmetros calculados como função dos estimados são apresentados na Tabela 5.24, cujas simulações são apresentadas na Figura 5.30. Analisando-se as simulações, pode ser verificado que o modelo foi capaz de descrever os dados experimentais de forma satisfatória, podendo ser utilizado para descrever o comportamento do processo. Além disso, o perfil de concentração de O_2 na fase gasosa (yO_2) indicou a produção de O_2 pela biomassa ao longo do tempo de cultivo.

Tabela 5.24 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos estimados e calculados

Parâmetro	Unidade	Valor	Parâmetro	Unidade	Valor
Parâmetros estimados					
μ_{max}	h^{-1}	0,0987	$Y_{CO2/X}$	$g_{CO2}\, g_X^{-1}$	1,307
K_{sCO2}	g L^{-1}	0,00008	yO_{2in}	%	15
K_{sO2}	g L^{-1}	0,0001	K_{HCO2}	atm L mol^{-1}	44
K_{iO2}	g L^{-1}	0,30	$K_L a_{CO2}$	h^{-1}	0,3887
K_{sIav}	μmol m^{-2} s^{-1}	557,34	kf_1	h^{-1}	9825
I_{mm}	μmol m^{-2} s^{-1}	8564,68	kf_2	h^{-1}	$7{,}6\ 10^{13}$
E_0	$g^{1,68}$ $L^{1,68}$	6	kf_3	L mol^{-1} h^{-1}	0,21
E_1	$L^{1,68}$ $g^{1,68}$	1,72	kb_1	L mol^{-1} h^{-1}	695,5
n	--	1,68	kb_2	L mol^{-1} h^{-1}	55000
pH_{opt}	--	6,2	kb_3	h^{-1}	$2{,}56\ 10^{7}$
pH_{min}	--	4	K_1	mol L^{-1}	$1{,}16\ 10^{-7}$
pH_{max}	--	13,8	K_2	mol L^{-1}	$8{,}20\ 10^{-11}$
T_{opt}	°C	34	η	--	0,7995
T_{min}	°C	24	φ	--	0,9498
T_{max}	°C	45	k_d	h^{-1}	0,0185
$Y_{O2/X}$	$g_{O2}\, g_X^{-1}$	0,4352			
Parâmetros calculados					
CO_{2eq}	%	0,454	$K_L a_{O2}$	h^{-1}	0,3927
O_{2eq}	%	0,016	CO_{2in}	mol L^{-1}	0,0036
O_{2in}	mol L^{-1}	0,00015			

Os resultados indicaram que a temperatura ótima para o crescimento da biomassa foi de 34 °C, o que concorda com os dados da Figura 5.23, que indicaram que a cepa respondeu melhor a temperaturas acima de 30 °C. Com relação aos extremos da temperatura, a mínima foi de 24 °C, e a máxima foi de 45 °C. Já para o pH, o valor ótimo estimado foi de 6,2, ponto em que, de acordo com a Figura 2.5, as concentrações de HCO_3^- e CO_2 dissolvido são

próximas, indicando que a cepa metaboliza facilmente estas duas espécies. Os valores mínimo e máximo para o pH foram de 4 e 13,8.

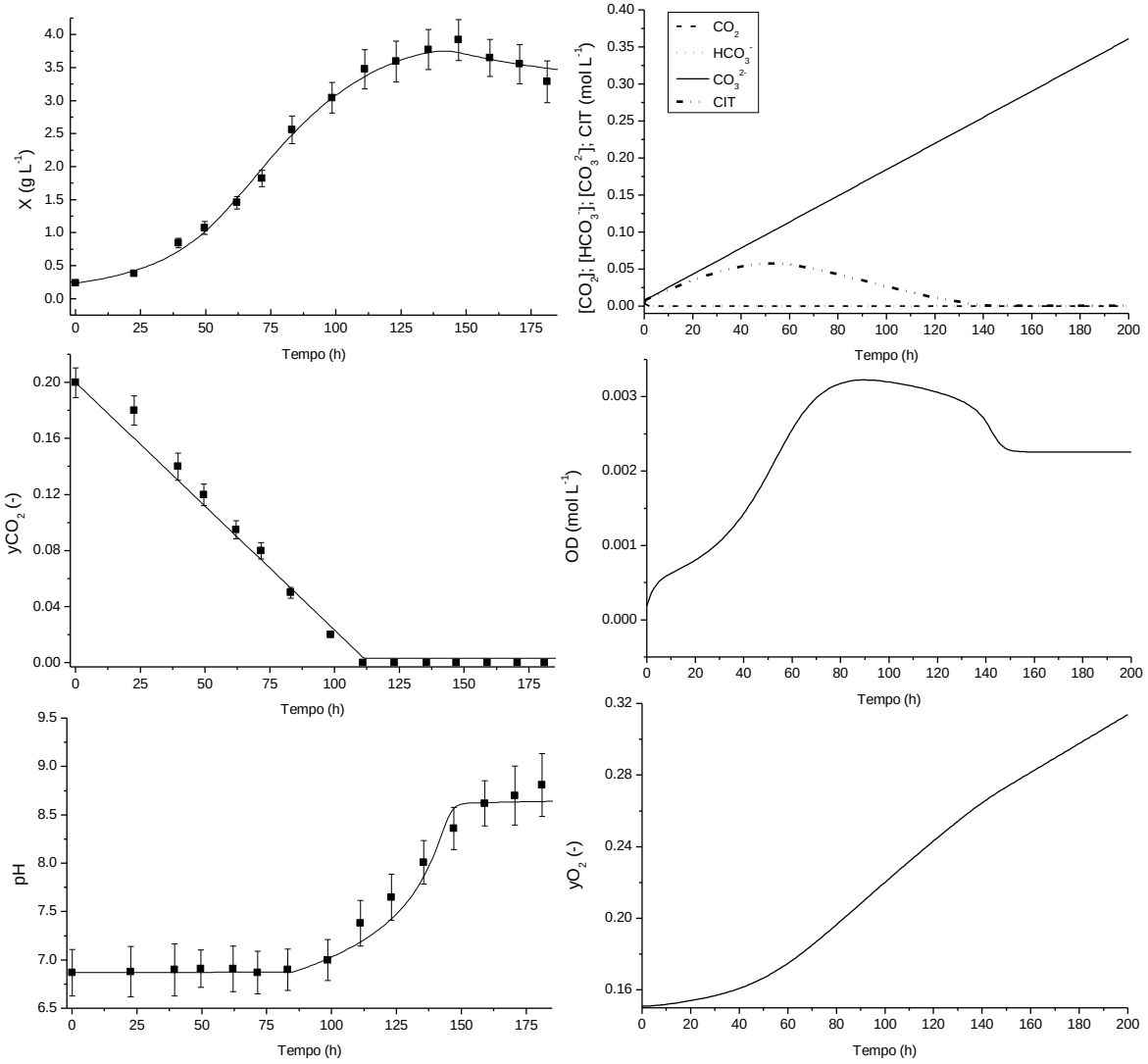

Figura 5.30 – Simulações do modelo proposto aplicado aos dados experimentais de crescimento de *Poterioochromonas malhamensis* em cultivo fechado

Avaliando-se os dados experimentais e aplicando-se a lei dos gases ideais (~ 120 L, 1 atm e 32 °C), foi obtido um fator experimental de conversão de CO_2 em células de 1,17 $g_{CO2}\ g_X^{-1}$, valor muito próximo daquele estimado pelo modelo, que foi de 1,3 $g_{CO2}\ g_X^{-1}$.

O coeficiente k_d foi estimado em 0,0185 h^{-1}, indicando que houve pequena parcela de morte celular.

A constante de saturação (K_s) do modelo de Monod (1949) é definida como a concentração da espécie no qual μ é igual à metade de $\mu_{máx}$. Quanto menor o valor de K_S, maior será a afinidade entre as células e o substrato, e, portanto, maior será o seu rendimento

em biomassa $Y_{S/CO2}$. Analisando os resultados obtidos a partir do modelo estudado, foi verificada maior afinidade da microalga com o CO_2 quando comparada ao O_2, já que K_{sCO2} foi menor que K_{sO2}. Essa afinidade foi quantificada pelo valor de $Y_{CO2/X}$, que foi maior que o $Y_{O2/X.}$

Analisando os parâmetros relacionados ao modelo de luz, a constante de saturação (K_{sIav}) foi estimada em 557,34 μmol m^{-2} s^{-1} e a constante de inibição (I_{mm}), que indica a intensidade luminosa na qual o crescimento celular é completamente inibido, foi estimada em 8564,68 μmol m^{-2} s^{-1}. Estes valores sugeriram que a intensidade luminosa utilizada experimentalmente (~ 300 μmol m^{-2} s^{-1}) foi menor que o valor de saturação, o que pode ter sido responsável pelo alto valor de μ_{max} estimado, que foi maior que aquele observado experimentalmente.

Para avaliar quantitativamente a influência de cada um dos parâmetros estimados sobre as respostas (X, yCO_2 e pH), foi realizada uma análise de sensibilidade dos parâmetros. Aplicando-se um aumento e diminuição de 5% em cada parâmetro com base nos valores estimados (Tabela 5.24), foi calculada a diferença na soma quadrática entre os valores observados experimentalmente e calculados pelo modelo. Os resultados obtidos foram padronizados e estão apresentados na Figura 5.31.

Pela análise dos resultados para o yCO_2, foi verificado que os únicos parâmetros que influenciaram na resposta foram o coeficiente de Henry para o CO_2 (K_{HCO2}) e o coeficiente volumétrico de transferência de massa para o CO_2 (K_La_{CO2}), o que é confirmado pela Equação 5.33.

Por outro lado, considerando-se o X e o pH, diversos parâmetros influenciaram na resposta do modelo, sendo T_{opt} o mais significativo. Além deste, o μ_{max} também apresentou forte influência sobre as duas variáveis estudadas. Adicionalmente, foi verificado que os parâmetros exerceram influência similar sobre o X e o pH, indicando que a concentração da biomassa influencia significativamente no pH da solução.

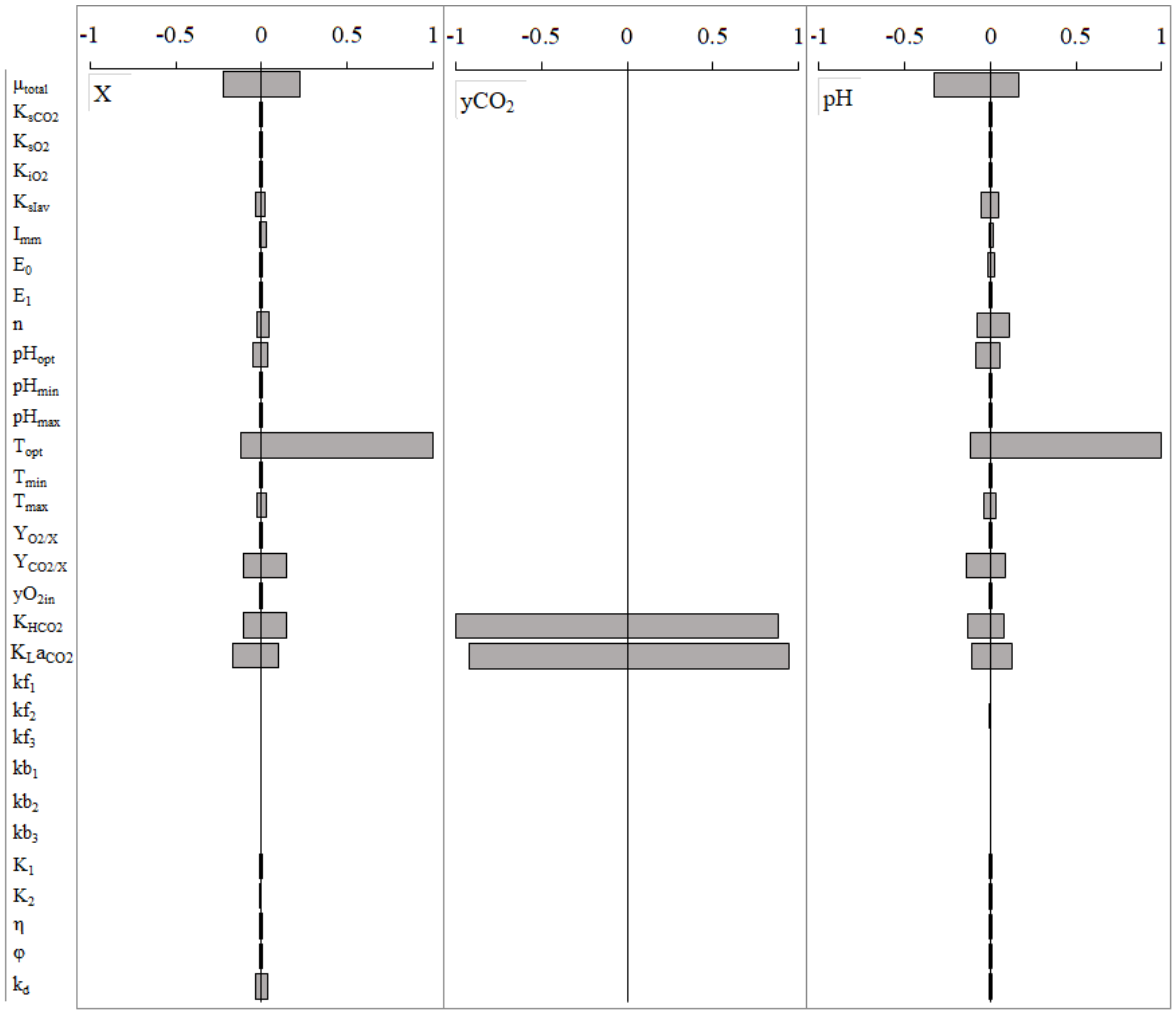

Figura 5.31 – Análise de sensibilidade dos parâmetros do modelo proposto

5.2.4.3 Considerações finais – Nível IV

Observando-se os resultados obtidos no estudo do quarto nível hierárquico, foi possível verificar a importância desta etapa na compreensão do processo de cultivo de microalgas em PBR. A construção de equações estequiométricas considerando as principais variáveis do sistema permitiu a avaliação de modelos cinéticos que descreveram a taxa de crescimento da biomassa em função da T, pH, CIT, OD e I_{av}, além da quantificação da influência de cada parâmetro sobre as variáveis X, pH e yCO_2.

Pela simulação do modelo proposto ajustado aos dados experimentais do cultivo de *Poterioochromonas* em sistema fechado, verificou-se que o modelo descreveu os dados de forma satisfatória. Assim, os parâmetros estimados podem ser utilizados para prever o comportamento do sistema utilizando apenas ar e CO_2 no gás de entrada.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

6 - Conclusões

O estudo do processo de cultivo de microalgas em PBR foi dividido em quatro níveis hierárquicos pela aplicação da TGS, permitindo a avaliação independente dos diferentes níveis do processo, mesmo que estes sejam interdependentes. A TGS mostrou-se uma importante ferramenta para o estudo do sistema proposto, por dividi-lo em níveis multidisciplinares, que se relacionam para chegar a conclusões globais sobre o processo, facilitando a compreensão de problemas com elevada complexidade.

Acerca do primeiro nível, foram avaliadas as características de TM e do fluxo dos fluidos dentro do PBR proposto. O planejamento fatorial fracionado forneceu modelos estatisticamente validos para descrever as variáveis da transferência de massa ($K_L a_{O_2}$, $K_L a_{CO_2}$, O_2^{eq} e CO_2^{eq}) em função das condições ajustáveis do sistema, além de possibilitar a avaliação da influência de cada fator e de suas interações sobre as respostas. A aplicação da fluidodinâmica computacional permitiu estudar os módulos dispersores de bolhas propostos e determinar o mais indicado para o aumento da produtividade do PBR, sem a necessidade de experimentos extensivos. As simulações indicaram que o módulo dispersor de bolhas perfurado aumentou a frequência dos ciclos claro-escuro, melhorando a probabilidade de que as células fossem direcionadas para as regiões iluminadas do PBR. Esta hipótese foi confirmada pelos resultados experimentais obtidos.

O estudo da tolerância da cepa frente aos parâmetros ajustáveis do sistema, realizado no segundo nível hierárquico, indicou que a cepa utilizada respondeu melhor a temperaturas acima de 30 °C e elevadas intensidades luminosas. A técnica de pulsos aplicada permitiu a compreensão do processo e avaliação de diversos parâmetros sobre a resposta do sistema pela realização de apenas um cultivo. Além disso, os meios M-8 e BG-11 foram otimizados para a produção de 1 g L^{-1} de biomassa utilizando-se a PML, com base na composição centesimal das células de *Poterioochromonas malhamensis*. Os meios originais e otimizados foram avaliados quanto à produção de biomassa e o teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos clorofila-a, clorofila-b e carotenoides das células. A partir dos ensaios, foi verificado que o melhor meio para a produção de biomassa foi o M-8 otimizado. Este meio foi então utilizado nos experimentos de avaliação da fonte de nitrogênio utilizada, que avaliou 3 fontes inorgânicas e uma orgânica, apontando para a ureia como a mais indicada para a produção de biomassa.

O terceiro nível, que consistiu na construção de equações baseadas na modelagem matemática de modelos não-estruturados e não-segregados, permitiu a avaliação de um modelo cinético composto por 5 equações que descreveram a taxa de crescimento da biomassa em função da temperatura (μ_T), pH (μ_{pH}), concentração de carbono inorgânico dissolvido (μ_{CIT}), concentração de OD (μ_{OD}) e intensidade luminosa média (μ_{Iav}). A partir do estudo realizado neste nível, foi proposto o modelo simplificado, que foi avaliado no quarto nível.

O modelo proposto, que compreendeu o sistema de EDOs com a modelagem estequiométrica acoplado aos modelos cinéticos da literatura e as equações obtidas pela modelagem da transferência de massa foi ajustado aos dados experimentais do cultivo de *Poterioochromonas malhamensis* em PBR fechado no quarto nível hierárquico. O estudo da sensibilidade dos 32 parâmetros estimados sobre as variáveis X, pH e yCO_2 avaliou quantitativamente a influência de cada parâmetro sobre a resposta do sistema.

A partir do trabalho realizado, foi proposto um modelo simplificado, capaz de descrever os dados experimentais de crescimento de *Poterioochromonas malhamensis* em PBR fechado de forma satisfatória, podendo ser utilizado para prever o comportamento do sistema estudado. Além disso, a utilização do módulo dispersor de bolhas perfurado permitiu alcançar uma concentração final de biomassa de 15,7 g L^{-1}, o que representa um valor elevadíssimo para sistemas deste porte.

Referências Bibliográficas

ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P., TORRES, E., HERRERO, C. **Microalgas: cultivo y aplicaciones**. Monografias v. 26, Universidade da Coruña, 1995.

ABE, K., KONDOH, T., NAGANO, Y. **A New Turbulence Model for Predicting Fluid Flow and Heat Transfer in Separating and Reattaching Flows—I. Flow Field Calculations**. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v. 37, n. 1, p. 139–151, 1994.

AIBA, S., SHODA, M., NAGALANI, M. **Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation.** *Biotechnology Bioengineering*, v.10, p. 845-864, 1968.

AIBA, S. **Growth kinetics of photosynthetic microorganisms**, *Advanced Biochemical Engineering*, v. 23, p. 85–156, 1982.

AL-ANEZI, K., SOMERFIELD, C., MEE, D., HANKINS, N., HILAL, N. **Effect of anti-scale agents on the solubility of CO2 in seawater at temperatures of 60 to 90ºC and pressures of 1–2 bar**. *Desalination*, v. 227, n. 1-3, p. 46-56, 2008.

ALAGESAN, S., GAUDANA, S.B., KRISHNAKUMAR, S., WANGIKAR, P.P. **Model based optimization of high cell density cultivation of nitrogen-fixing cyanobacteria**. *Bioresource Technology*, v. 148, p. 228–233, 2013.

ALVARENGA, G. B. Um algoritmo híbrido para o problema de roteamento de veículos estático e dinâmico com janela de tempo. Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. Tese (Doutorado).

ABD ALI, M. K. **CFD simulation of bubbly flow through a bubble column.** *International Journal of Scientific and Engineering Research*, v. 5, p. 7, 2014.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques.** Elsevier Academic Press, 578 p, 2005.

ANDREWS, L. F. **A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibition substrates.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 10, p. 707-723, 1968.

ARAVANTINOU, A., THEODORAKOPOULUS, M., MANARIOTIS, I. **Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production.** *Bioresource Technology*, v. 147, p. 130-134, 2013.

ARREDONDO-VEGA, B.O., VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. Centro de Investigaciones del Noroeste – CIBNOR(México). La Paz, 97 p, 2007.

BABCOCK, R. W., MALDA, J., RADWAY, J. C. **Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor.** *Journal of Applied Phycology*, v. 14, n. 3, p. 169-184, 2002.

BARBOSA, M. J., JANSSEN, M., HAM, N., TRAMPER, J., E WIJFFELS, R. H. **Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency**. *Biotechnology and Bioengineering* v. 82, p. 170–9, 2003.

BARNIER, H., SANTOS, P. F. F., GUDIN, C., THEPENIER, C. **Process for the production and extraction of polysaccharides from a *Porphyrium cruentum* culture and apparatus for performing the process.** US Patent 9,906,746, 1990.

BARSANTI, L., GUALTIERI, P. **Algae anatomy biochemistry and biotechnology**. London UK, Taylor & Francis Group, 2006.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2.ed. New York, McGraw-Hill, 1986.

BECKER, E. W. **Microalgae Biotechnology and microbiology.** Cambridge University Press, Cambridge, 1994.

BICUDO, C. E. M., MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: Chave para identificação e descrições.** Editora RIMA, São Carlos, 2006.

BIRD, R. B., STEWART, W. E., LIGHTFOOT, E. N. **Fenômenos de Transporte**. Ed. LTC, 2nd ed., 2004.

BITOG, J. P., LEE, I. B., LEE, C. G., KIM, K. S., HWANG, H. S., HONG, S. W., SEO, I. H., KWON, K. S., MOSTAFA, E. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: a review. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 76, n. 2, p. 131-147, 2011.

BOROWITZKA, M. A. **Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds**. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, n. 1, p. 3-15, 1995.

BOROWITZKA, M. A. **Energy from microalgae: A short history**, em: BOROWITZKA, M. A., MOHEIMANI, N. R. (Eds.), **Algae for biofuels and energy**. Springer Netherlands, pp. 133-152, 2013.

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

BURNS, A. **Photobioreactor design for improved energy efficiency of microalgae production.** California Polytechnic State University, 2014. Dissertação (Mestrado).

CAÑEDO, C. G., LIZÁRRAGA, L. L. **Considerations for photobioreactor design and operation for mass cultivation of microalgae.** Algae - Organisms for Imminent Biotechnology, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, 2016.

CARON, D. A., PORTER, K. G., SANDERS, R. W. **Carbon, nitrogen, and phosphorus budgets for the mixotrophic phytoflagellate *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) during bacterial ingestion.** *Limnology and Oceanography*, v. 35, n. 2, p. 433–443, 1990.

CHAICHALERM, S., POKETHITIYOOK, P., YUAN, W., MEETAM, M., SRITONG, K., PUGKAEW, W., KUNGVANSAICHOL, K., KRUATRACHUE, M., DAMRONGPHOL, P. **Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media.** *Applied Energy*, v. 89, n. 1, p. 296 – 302, 2012.

CHEN, J. L., PROTEAU, P. J., ROBERTS, M. A., GERWICK, W. H., SLATE, D. L., LEE, R. H. **Structure of Malhamensilipin A, an Inhibitor of Protein Tyrosine Kinase, from the Cultured Chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*.** *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 4, p. 524–527, 1994.

CHISTI, Y., MOLINA, E., FERANADEZ, J., ACIEN, F.G. **Tubular photobioreactor design for algal cultures.** *Journal of Biotechnology*, v. 92, p. 113 – 131, 2001.

CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae.** *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHENG, H. H., WHANG, L. M., CHAN, K. C., CHUNG, M. C., WU, S. H., LIU, C. P., LEE, W. J. **Biological butanol production from microalgae-based biodiesel residues by *Clostridium acetobutylicum*.** *Bioresource technology*, v. *184*, p. 379 – 385, 2015.

CHIU, S. Y., KAO, C. Y., CHEN, T. Y., CHANG, Y. B., KUO, C. M., & LIN, C. S. **Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource.** *Bioresource technology*, v. 184, p. 179 – 189, 2015.

CHOI, K. H., CHISTI, Y., MOO-YOUNG, M. **Comparative evaluation of hydrodynamic and gas-liquid mass transfer characteristics in bubble column and airlift slurry reactors.** *Chemical Engineering Journal-Including Biochemical Engineering Journal*, v. 62, n. 3, p. 223-230, 1996.

CHRISTENSON, L., SIMS, R., **Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts.** *Biotechnology Advances,* v. 29, p. 686-702, 2011.

COLLA, L., RUIZ, W. A., COSTA, J. A. V. **Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas.** *Vetor*, v. 12, p. 61 – 78, 2002.

COMSOL. **CFD Module: User's Guide,** 2013

CONSTANTINO, A. A., JUNIOR, A. M. G. **Um algoritmo genético híbrido para o problema de corte industrial bidimensional.** *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 06, p. 1727-1731, 2002.

CORRÊA, D. O., DUARTE, M. E. R., NOSEDA, M. D. **Biomass production and harvesting of *Desmodesmus subspicatus* cultivated in flat plate photobioreactor using chitosan as flocculant agent.** *Journal of Applied Phycology*, p. 1-10, 2018.

CROFT, M.T., WARREN, M.J., SMITH, A.G. **Algae need their vitamins.** *Eukaryotic Cell*, v. 5, p. 1175 – 1183, 2006.

CROWE, C., SOMMERFELD, M., TSUJI, Y. **Multiphase Flows with Droplets and Particles**, CRC Press, 1998.

DARZINS, A., PIENKOS, P., EDYE, L. **Current status and potential for algal biofuels production.** IEA Bioenergy Task 39, Report T39-T2, 2010.

DAVIS E. A., DEDRICK J., FRENCH C. S., MILNER H. W., MYERS J., SMITH J. H. C., SPOEHR H. A. **Laboratory experiments on Chlorella culture at the Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology.** In: BURLEW J. S. (ed) **Algal culture: from laboratory to pilot plant.** Carnegie Institution of Washington, Washington, DC, pp 105–153, 1953.

DEGEN, J., UEBELE, A., RETZE, A., SCHMID-STAIGER, U., TRÖSCH, W. **A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect.** *Journal of Biotechnology*, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2001.

DEMIRBAS, A. **Use of algae as biofuel sources.** *Energy conversion and management*, v. 51, n. 12, p. 2738 – 2749, 2010.

DERNER, R. B., BUITRAGO, E., OLIVERA, A., PINASKO, K. **Crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* en ambiente cerrado y abierto bajo diferentes fotoperiodos y medios nutritivos.** *Memórias de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, Venezuela, v. 54, n. 142, p. 03 – 08, 1994.

DERNER, R. B. **Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe Bacillariophyceae) sob diferentes regimes de iluminação, na Região sul do Brasil. 1995.** Florianópolis: Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995. 108 p. Dissertação (Mestrado).

DIN, N. G. S. EL., EL-SHERIF, Z. M. **Nutritional value of some algae from the north-western Mediterranean coast of Egypt.** *Journal of Applied Phycology*, v. 24, p. 613 – 626, 2012.

DOGARIS, I., WELCH, M., MEISER, A., WALMSLEY, L., PHILIPPIDI, G. **A novel horizontas photobioreactor foi high-density cultivation of microalgae**. *Bioresource technology*, v. 198, p. 316 – 324, 2016.

DRAGONE, G., FERNANDES, B. D., ABREU, A. P., VICENTE, A. A., TEIXEIRA, J. A. **Nutrient limitation as a strategy for increaseing starch accumulation in microalgae.** *Applied energy*, v. 88, p. 3331 – 3335, 2011.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. T., SMITH, F. **Colorimetric method for determination of sugars and related substances.** *Analytical chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUFOSSÉ, L., GALAUP, P., YARON, A., ARAD, S. M., BLANC, P., MURTHY, K. N. C., RAVISHANKAR, G. A. **Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?.** *Trends in Food Science & Technology*, v. *16, n.* 9, p. 389 – 406, 2005.

DUONG, V. T., AHMED, F., THOMAS-HALL, S. R., QUIGLEY, S., NOWAK, E., SCHENK, P. M. **High protein-and high lipid-producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel.** *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. *3*, n. 53, 2015.

EBRAHIMI, S., PICIOREANU, C., KLEEREBEZEM, R., HEIJNEN, J. J., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. **Rate-based modelling of SO_2 absorption into aqueous $NaHCO_3/Na_2CO_3$ solutions accompanied by the desorption of CO_2.** *Chemical engineering science*, v. 58, n. 16, p. 3589-3600, 2003.

EDWARDS, V. H. **The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.12, p.679-712, 1970.

EJIKE, C. E., COLLINS, S. A., BALASURIYA, N., SWANSON, A. K., MASON, B., & UDENIGWE, C. C. (2017). **Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health.** *Trends in food science & technology*, *59*, 30-36.

EROGLU, E., MELIS, A. **Microalgal hydrogen production research.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016.

ESCAPA, C., COIMBRA, R. N., PANIAGUA, S., GARCÍA, A. I., & OTERO, M. **Paracetamol and salicylic acid removal from contaminated water by microalgae.** *Journal of Environmental Management*, 2016.

EVERS, E. G. **A model for light-limited continuous cultures: growth, shading, and maintenance**. *Biotechnology Bioeng*ineering, v. 38, p. 254–259, 1991.

EZE, C. N., OGBONNA, J. C., OGBONNA, I. O., AOYAGI, H. **A novel flat plate air-lift photobioreactor with inclined reflective broth circulation guide for improved biomass and lipid productivity by *Desmodesmus subspicatus* LC172266.** *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 6, p. 2745-2754, 2017.

FABREGAS, J., OTERO, A., DOMINGUEZ, A., PATINO, M. **Growth rate of the microalga Tetraselmis suecica changes the biochemical composition of *Artemia* species.** Marine Biotechnology, v. 3, p. 256 – 263, 2001.

FALKOWSKI, P. G., RAVEN, J. A. **Aquatic photosynthesis**. Princeton University Press, Second Edition, 2007.

FAO. **Algae-Based Biofuels - A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries**. Roma, 2009.

FASAHATI, P., WOO, H. C., LIU, J. J. **Industrial-scale bioethanol production from brown algae: Effects of pretreatment processes on plant economics.** *Applied Energy*, v. 139, p. 175-187, 2015.

FAZAL, T., MUSHTAQ, A., REHMAN, F., KHAN, A. U., RASHID, N., FAROOQ, W., REHMAN, M. S. U., XU, J. **Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, n. 3, p. 3107-3126, 2017.

FENG, P., DENG, Z., HU, Z., FAN, L. **Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors.** *Bioresource technology*, v. 102, n. 22, p. 10577-10584, 2011.

FRAMPTON, D. M. F., GURNEY, R. H., DUNSTAN, G. A., CLEMENTSON, L. A., TOIFL, M. C., POLLARD, C. B., BURN, S., JAMESON, I. D., BLACKBURN, S. I., **Evaluation of growth, nutrient utilization and production of bioproducts by wastewater-isolated microalga.** *Bioresource Technology*, v. 130, p. 261 – 268, 2013.

FURBEYRE, H., VAN MILGEN, J., MENER, T., GLOAGUEN, M., LABUSSIÈRE, E. **Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets.** *Animal*, v. 11, n. 2, p. 183-192, 2017.

FURUHASHI, T., NAKAMURA, T., FRAGNER, L., ROUSTAN, V., SCHÖN, V., WECKWERTH, W. B**iodiesel and poly-unsaturated fatty acids production from algae**

and crop plants–a rapid and comprehensive workflow for lipid analysis. *Biotechnology Journal*, v. *11*, *n.* 10, p. 1262 – 1267, 2016.

GAO, X., KONG, B., VIGIL, R. D. **Characteristic time scales of mixing, mass transfer and biomass growth in a Taylor vortex algal photobioreactor.** *Bioresource Technology*, v. 198, p. 283 – 291, 2015.

GARCÍA, S., PATERNINA, E., PUPO, O. R., BULA, A., ACUÑA, F. **CFD Simulation of multiphase flow in an airlift column photobioreactor for the cultivation of microalgae.** In *ASME 2012 6th International Conference on Energy Sustainability collocated with the ASME 2012 10th International Conference on Fuel Cell Science, Engineering and Technology* (p. 1253-1262). American Society of Mechanical Engineers, 2012.

GRAZIANI, G., SCHIAVO, S., NICOLAI, M. A., BUONO, S., FOGLIANO, V., PINTO, G., POLLIO, A. **Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga Galdieria sulphuraria**. *Food & function*, v. 4, n. 1, p. 144 – 152, 2013.

GROBBELAAR, J. U. **Microalgal biomass production: challenges and realities.** *Photosynthesis research*, v. 106, p. 135 – 144, 2010.

GROSS, M. **Development and optimization of algal cultivation systems.** Iowa State University, 2013. Tese (doutorado).

GUDIN C. **Method of growing plant cells**. US Patent 3,955,317, 1976.

GUIL-GUERRERO, J. L., NAVARRO-JUÁREZ, R., LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C., CAMPRA-MADRID, P., REBOLLOSO-FUENTES, M. M. **Functionnal properties of the biomass of three microalgal species.** *Journal of food engineering*, v. 65, p. 511 – 517, 2004.

GUO X., YAO L., HUANG Q. **Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae.** *Bioresource Technology*, v. 190, p. 189 – 195, 2015.

HALL, D. O., ACIEN FERNANDEZ, F. G., CANIZARES GUERRERO, E., KRISHNA RAO, K., MOLINA GRIMA, E. **Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity.** *Biotechnology Bioengineering*, v. 82, p. 62 – 73, 2003.

HAMILTON, R., CASASÚS, A., RASCHE, M., NARANG, A., SVORONOS, S. A., KOOPMAN, B. **Structured model for denitrifier diauxic growth.** *Biotechnology Bioengineering*, v.90, n.4, p.501-508, 2005.

HAYES, M., BASTIAENS, L., GOUVEIA, L., GKELIS, S., SKOMEDAL, H., SKJANES, K., ... & KONSTANTINOU, D. **Microalgae-based proteins for feed, food and health.** Em: GONZALES-FERNANDES, C., MUÑOZ, R. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**, WP – Woodhead publishing, p. 347-368, 2017.

HE, Y., WU, T., WANG, X., CHEN, B., CHEN, F. **Cost-effective biodiesel production from wet microalgal biomass by a novel two-step enzymatic process**. *Bioresource technology*, v. 268, p. 583-591, 2018.

HEINEN, M. R., OSÓRIO, F. S. **Algoritmos genéticos aplicados ao problema de roteamento de veículos.** *HÍFEN*, v. 30, n. 58, 2006.

HEMALATHA, M., MOHAN, S. V. **Microalgae cultivation as tertiary unit operation for treatment of pharmaceutical wastewater associated with lipid production.** *Bioresource technology*, v. *215*, p. 117 – 122, 2016.

HERNÁNDEZ, D., RIAÑO, B., COCA, M., GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. **Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production.** *Chemical Engineering Journal*, v. *262*, p. 939 – 945, 2015.

HINTERHOLZ, C. L. **Algoritmo genético na estimação de parâmetros da produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator*.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2014. Dissertação (Mestrado)

HOLLAND, J. H. **Adaptation in Natural and Artificial Systems**, University of Michigan Press, 1975.

HU, Q., GUTERMAN, H., RICHMOND, A. **A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 51, n. 1, p. 51-60, 1996.

HU, Q., FAIMAN, D., RICHMOND, A., **Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, p. 230 – 236, 1998a.

HU, Q., KURANO, N., KAWACHI, M., IWASAKI, S., MIYACHI, S. **Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor.** *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 49(6), 655–662, 1998b.

HU, J., NAGARAJAN, D., ZHANG, Q., CHANG, J. S., LEE, D. J. **Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: a review.** *Biotechnology advances*, v. 36, p. 54 – 67, 2018.

HUANG, J., LI, Y., WAN, M., YAN, Y., FENG, F., QU, X., WANG, J., SHEN, G., LI, W., FAN, J., WANG, W. **Novel flat-plate photobioreactors for microalgae cultivation with special mixers to promote mixing along the light gradient.** *Bioresource technology*, v. 159, n. 8-16, 2014.

HUANG, J., FENG, F., WAN, M., YING, J., LI, Y., QU, X., PAN, R., SHEN, G., LI, W. **Improving performance of flat-plate photobioreactors by installation of novel internal mixers optimized with computational fluid dynamics.** *Bioresource Technology*, v. 182, p. 151–159, 2015.

HULATT, C. J., WIJFFELS, R. H., BOLLA, S., KIRON, V. **Production of fatty acids and protein by Nannochloropsis in flat-plate photobioreactors.** *PloS one*, v. 12, n. 1, e0170440, 2017.

ISLAM, M. A., HEIMANN, K., BROWN, R. J. **Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 79, p. 1160-1170, 2017.

JANSSEN, M., TRAMPER, J., MUR, L. R., WIJFFELS, R. H. **Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects.** *Biotechnology Bioengineering*, v. 81, p. 193 – 210, 2003.

JONES, K. D., KOMPALA, D. S. **Cybernetic model of the growth dynamics of Saccharomyces cerevisiae in batch and continuous cultures.** *Journal of Biotechnology*, v.71, p.105-131, 1999.

ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H., SHALES, S. W. **Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 631 – 635, 2000.

KHADIM, S. R., SINGH, P., SINGH, A. K., TIWARI, A., MOHANTA, A., ASTHANA, R. K. **Mass cultivation of Dunaliella salina in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting.** *Bioresource Technology*, 2018.

KAFFAROV, V. V., VINAROV, A. J., GORDEEV, L. S. **Modeling biochemical reactors.** Lesnaya Promishlenost (Publisher Forrest Industry), Moscow, 1979.

KAFFAROV, V. V., VINAROV, A. J., GORDEEV, L. S. **Modeling and system analysis of biochemical industrial production.** Lesnaya Promishlenost (Publisher Forrest Industry), Moscow, 1985.

KANDILIAN, R., TSAO, T. C., PILON, L. **Control of incident irradiance on a batch operated flat-plate photobioreactor.** *Chemical Engineering Science*, v. 119, p. 99-108, 2014.

KARP, G. **Biologia celular e molecular.** Terceira edição. Manole, 2005.

KANDILIAN, R., PRUVOST, J., LEGRAND, J., PILON, L. **Influence of light absorption rate by *Nannochloropsis oculata* on triglyceride production during nitrogen starvation.** *Bioresource technology*, v. 163, p. 308-319, 2014.

KENT M., WELLADSEN H. M., MANGOTT A., LI Y. **Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements.** *Plos one,* v. 10, n. 2, 2015.

KLASSEN, V., BLIFERNEZ-KLASSEN, O., HOEKZEMA, Y., MUSSGNUG, J. H., & KRUSE, O. **A novel one-stage cultivation/fermentation strategy for improved biogas production with microalgal biomass.** *Journal of biotechnology*, v. *215*, p. 44 – 51, 2015.

KIM, H. M., OH, C. H., BAE, H. J. **Comparison of red microalgae (Porphyridium cruentum) culture conditions for bioethanol production.** *Bioresource technology*, v. 233, p. 44-50, 2017.

KIRK, J. T. O. **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems.** Cambridge University Press, 1994, 509 p.

KOCHEM, L. H., DA FRÉ, N. C., REDAELLI, C., RECH, R., MARCÍLIO, N. R. **Characterization of a novel flat-panel airlift photobioreactor with an internal heat exchanger.** *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

KOK, B. **On the inhibition of photosynthesis by intense light**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 21, n. 2, p. 234-244, 1956.

KOKKINOS, N., LAZARIDOU, A., STAMATIS, N., ORFANIDIS, S., MITROPOULOS, A. C., CHRISTOFORIDIS, A., NIKOLAOU, N. **Biodiesel production from selected microalgae strains and determination of its properties and combustion specific characteristics.** *Journal of Engineering Science & Technology Review*, v. 8, n. 4, 2015.

KOLLER, A. P., WOLF, L., BRÜCK, T., WEUSTER-BOTZ, D. **Studies on the scale-up of biomass production with *Scenedesmus* spp. in flat-plate gas-lift photobioreactors.** *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 41, n. 2, p. 213-220, 2018.

KOMPALA, D. S., RAMKRISHNA, D., JANSEN, N. B., TSAO, G. T. **Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models.** *Biotechnology Bioengineering*, v.28, p.1044-1055, 1986.

KRISHNA, R., VAN BATEN, J. M., URSEANU, M. I. **Three-phase Eulerian simulations of bubble column reactors operating in the churn-turbulent regime: a scale up strategy.** *Chemical Engineering Science*, v. 55, n. 16, p. 3275-3286, 2000.

KROUMOV, A., GACHEVA, G., ILIEV, I., ALEXANDROV, S., PILARSKI, P., PETKOV, G. **Analysis of Sf/V ratio of photobioreactors linked with algal physiology.** *Genetics and Plant Physiology*, v. *3*, p. 55 – 64, 2013.

KROUMOV, A. D., MÓDENES, A. N., TRIGUEROS, D. E. G., ESPINOZA-QUIÑONES, F. R., BORBA, C. E., SCHEUFELE, F. B., HINTERHOLZ, C. L. **A systems approach for CO2 fixation from flue gas by microalgae—Theory review.** *Process Biochemistry*, v. 51, n. 11, p. 1817-1832, 2016.

KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J., MALCATA, F. X., LANGENHOVE, H. V. **Enhanced CO_2 fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions**. *Trends in Biotechnology*, v. 28, p. 371 – 380, 2010.

KUMAR, K., DASGUPTA, C. N., NAYYAK, B., LINDBLAD, P., DAS, D. **Development of suitable photobioreactor for CO2 sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria.** *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4945 – 4953, 2011.

LAVRIC, V.; IANCU, P.; PLESU, V. **Genetic algorithm optimization of water consumption and wastewater network topology.** *Journal of Cleaner Production*, v. 13, p. 1405-1415, 2005.

LEE, R. E. **Phycology**. 4th Edition, Cambridge, 2008. 547p.

LEE, Y., SHEN, H. **Basic culturing techniques.** Em: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** England: Blackwell Publishing, 2004. p. 40-56.

LEBEAU, T., ROBERT, J. M. **Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales.** *Applied Microbiology and biotechnology*, v. 60, n. 6, p. 612 – 623, 2003.

LEUPOLD, M., HINDERSIN, S., GUST, G., KERNER, M., HANELT, D. **Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Journal of applied phycology*, v. 25, n. 2, p. 485-495, 2013.

LEVINE, I. A., FLEURENCE, J. (Eds). **Microalgae in Health and disease prevention.** Elsevier, Academic Press, 2018.

LI, J., XU, N. S., SU, W. W. **Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, n. 1, p. 51-65, 2003.

LICHTENTHALER, H. K., BUSCHMANN, C. **Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy.** *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001.

LOPES, E. J. **Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (doutorado).

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006. 606p.

LUO, H. P., AL-DAHHAN, M. H. **Verification and validation of CFD simulations for local flow dynamics in a draft tube airlift bioreactor.** *Chemical Engineering Science*, v. 66, n. 5, p. 907-923, 2011.

MACINTYRE, H. L., KANA, T. M., ANNING, T., GEIDER, R. J. **Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria**. *Journal of phycology*, v. 38, n. 1, p. 17 – 38, 2002.

MANDALAM, R. K., PALSSON, B. **Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures.** *Biotechnology and bioengineering*, v. 59, n. 5, p. 605-611, 1998.

MARANDUBA, H. L., ROBRA, S., NASCIMENTO, I. A., DA CRUZ, R. S., RODRIGUES, L. B., DE ALMEIDA NETO, J. A. **Improving the energy balance of microalgae biodiesel: Synergy with an autonomous sugarcane ethanol distillery**. *Energy*, v. 115, p. 888 – 895, 2016.

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

MATOS, J., CARDOSO, C., BANDARRA, N. M., & AFONSO, C. **Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review**. *Food & function*, v. 8, n. 8, p. 2672-2685, 2017.

MARTÍNEZ ANDRADE, K. A., LAURITANO, C., ROMANO, G., IANORA, A. (2018). **Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties.** *Marine drugs*, v. 16, n. 5, p. 165, 2018.

MAZZUCA SOBCZUCK, T.; GARCIA CAMACHO, F.; CAMACHO RUBIO, F.; ACIEN FERNANDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. **Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors.** *Biotechnology and Bioengineering*. v. 67, p. 465 – 75, 2000.

MEIER, L., BARROS, P., TORRES, A., VILCHEZ, C., JEISON, D. **Photosynthetic biogas upgrading using microalgae: Effect of light/dark photoperiod.** *Renewable energy*, v. 106, p. 17-23, 2017.

MENDES, R. L., NOBRE, B. P., CARDOSO, M. T., PEREIRA, A. P., PALAVRA, A. F. **Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae**. *Inorganica Chimica Acta*, v. *356*, p. 328 – 334, 2003.

MENTER, F.R. **Two-Equation Eddy-Viscosity Turbulence Models for Engineering Applications**, *AIAA Journal*, v. 32, n. 8, 1994.

MYERS, J., BURR, G. O. **Studies on photosynthesis: some effects of light of high intensity on Chlorella.** *The Journal of general physiology*, v. 24, n. 1, p. 45, 1940.

MIMOUNI, V., ULMANN, L., PASQUET, V., MATHIEU, M., PICOT, L., BOUGARAN, G., SCHOEFS, B. **The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest.** *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 13, *n.* 15, p. 2733 – 2750, 2012.

MOLINA, E., FERNÁNDEZ, J., ACIÉN, F. G., CHISTI, Y. **Tubular photobioreactor design for algal cultures.** *Journal of Biotechnology*, v. 92, p. 113 – 131, 2001.

MOLINA GRIMA, E.; SANCHEZ PEREZ, J. A.; GATCIA CAMACHO, F.; FERNANDEZ SEVILLA, J. M.; ACIEN FERNANDEZ, F. G.; URDA CARDONA, J. **Biomass and icosapentaenoic acid productivities from an outdoor batch culture of Phaeodactylum tricornutum UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 42, p. 658 – 663, 1995.

MOLINA GRIMA, E., FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M., SÁNCHEZ PÉREZ, J.A., CAMACHO, G. F. **A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances.** *Journal of Biotechnology*, v. 45, p. 59–69, 1996.

MONOD, J. **Research on the growth of bacterial cultures.** *Actualités Scientifique et Industrielles*, v.911, p.1-215 (in French), 1942.

MONTGOMERY, D. C., RUNGER, G. C., CALADO, V. **Estatística Aplicada E Probabilidade Para Engenheiros.** Grupo Gen-LTC, 2000.

MOUSAVI, S. M., JAFARI, A., YAGHMAEI, S., VOSSOUGHI, M., TURUNEN, I. **Experiments and CFD simulation of ferrous biooxidation in a bubble column bioreactor**. *Computers & Chemical Engineering*, v. 32, n. 8, p. 1681-1688, 2008.

MURRAY, G. M., THOMPSON, W. F. **Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.** Nucleic Acid Research, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.

NAGARAJAN, D., LEE, D. J., KONDO, A., CHANG, J. S. **Recent insights into biohydrogen production by microalgae–From biophotolysis to dark fermentation.** *Bioresource technology*, v. 227, p. 373-387, 2017.

NARANG, A. **Comparative analysis of some models of gene regulation in mixed-substrate microbial growth.** *Journal of Theoretical Biology*, v.246, p.489-501, 2006.

NAUHA, E. K., ALOPAEUS, V. **Modeling method for combining fluid dynamicsand algal growth in a bubble column photobioreactor**, *Chemical Engineering Journal*, v. 229, p. 559–568, 2013.

NEUMANN, U., LOUIS, S., GILLE, A., DERWENSKUS, F., SCHMID-STAIGER, U., BRIVIBA, K., BISCHOFF, S. C. **Anti-inflammatory effects of Phaeodactylum tricornutum extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages**. *Journal of Applied Phycology*, p. 1-10, 2018.

NEVES, V. T. D. C., SALES, E. A., & PERELO, L. W. **Influence of lipid extraction methods as pre-treatment of microalgal biomass for biogas production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 59, p. 160 – 165, 2016.

OGBONNA, J. C., TANAKA, H. **Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles.** *Bioresource Technology*, v. 65, p. 65 – 72, 2000.

OHSE, S., DERNER, R. B., OZÓRIO, R. A., CUNHA, P. C. R., LAMARCA, C. P., SANTOS, M. E., MENDES, L. B. B. **Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas.** *INSULA*, v. 36, p. 39 – 74, 2007.

O'KELLEY, J. C., **Mineral nutrition of algae.** *Annual Reviews of Plant Physiology*, v.19, p. 89 – 112, 1968.

ÖRDÖG, V., STIRK, W. A., LENOBEL, R., BANCÍŘOVÁ, M., STRNAD, M., VAN STADEN, J., NÉMETH, L. **Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites.** *Journal of applied phycology*, v. 16, n. 4, p. 309 – 314, 2004.

ORTEGA, A. R., ROUX, J.C. **Production of *Chlorella* biomass in different types of flat bioreactors in temperate zones.** *Biomass*, v. 10, p. 141–156, 1986.

OSWALD, W. J. **Large scale algal culture systems (engineering aspects).** In: Borowitzka, M. A., and Borowitzka, L. J., eds. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. p. 357 – 410, 1988.

PACHECO-VEGA, J. M., GAMBOA-DELGADO, J., ALVARADO-IBARRA, A. G., NIETO-LÓPEZ, M. G., TAPIA-SALAZAR, M., CRUZ-SUÁREZ, L. E. **Nutritional contribution of fish meal and microalgal biomass produced from two endemic microalgae to the growth of shrimp *Litopenaeus vannamei***. *Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 46, n. 1, 2018.

PARK, Y. T., LEE, H., YUN, H. S., SONG, K. G., YEOM, S. H., CHOI, J., **Removal of metal from acid mine drainage using a hybrid system including a pipes inserted microalgae reactor.** *Bioresource Technology*, v. 150, p. 242 – 248, 2013.

PARMAR, A., SINGH, N. K., PANDEY, A., GNANSOUNOU, E., MADAMWAR, D. **Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels.** *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10163 – 10172, 2011.

PASQUET, V., CHÉROUVRIER, J. R., FARHAT, F., THIÉRY, V., PIOT, J. M., BÉRARD, J. B., PICOT, L. **Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction**. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 59 – 67, 2011.

PATNAIK, P. R. **Are microbes intelligent beings? An assessment of cybernetic modeling.** *Biotechnoogyl Advances*, v.18, p.267-288, 2000.

PHWAN, C. K., ONG, H. C., CHEN, W. H., LING, T. C., NG, E. P., SHOW, P. L. **Overview: Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae.** *Energy Conversion and Management*, v. 173, p. 81-94, 2018.

PILOTO-RODRÍGUEZ, R., SÁNCHEZ-BORROTO, Y., MELO-ESPINOSA, E. A., VERHELST, S. **Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 69, p. 833-842, 2017.

PIRT S. J., LEE Y. K., WALACH M. R., PIRT M. W., BALYUZI H. H. M., BAZIN M. J. **A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 33B, p. 35–58, 1983.

POLING, B. E., PRAUSNITZ, J. M., O'CONNELL, J. P. The properties of gases and liquids. 5th edition, McGraw-Hill, 2004, 701 p.

PRANDTL, L. **Über ein neues Formelsystem für die ausgebildete Turbulenz.** Nachrichten der Akad. Wiss. Göttingen, Mathphys. p. 6, 1945.

PRUVOST, J., CORNET, J. F., LEGRAND, J. **Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis.** *Chemical Engineering Science*, v. 63, p. 3679–3694, 2008.

PULZ, O. **Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 57, p. 287 – 293, 2001.

PULZ, O., GROSS, W. **Valuable products from biotechnology of microalgae.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, p. 635 – 648, 2004.

QIANG, H., RICHMOND, A. **Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor.** *Journal of Applied Phycology*, v. 8, n. 2, p. 139-145, 1996.

RADMER, R. J. **Algal diversity and commercial algal products**. *American Institute of Biological Sciences*, v. 46, p. 263 – 270, 1996.

RAHEEM, W. A. K. G., WAN AZLINA, Y. H., TAUFIQ Y., MICHAEL K., DANQUAH, R. H. **Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 49, p. 990 – 999, 2015.

RAMANNA, L., RAWAT, I., ZERROUKI, D., BUX, F. **A novel organic dye-based approach to increase photon flux density for enhanced microalgal pigment production.** *Journal of Cleaner Production*, v. 198, p. 187-194, 2018.

RAMKRISHNA, R., RAMKRISHNA, D., KONOPKA, A.E. **Cybernetic modeling of growth in mixed, substitutable substrate environments: preferential and simulataneous utilization.** *Biotechnology Bioengineering*, v. 52, p. 141-151, 1996.

RATHA, S. K., PRASANA, R. **Bioprospecting microalgae as potential sources of 'green energy', challenges and perspectives.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 48, p. 109 – 125, 2012.

REYIMU, Z., ÍZŠIMEN, D. **Batch cultivation of marine microalgae Nannochloropsis oculata and Tetraselmis suecica in treated municipal wastewater toward bioethanol production.** *Journal of Cleaner Production*, v. 150, p. 40-46, 2017.

RICHMOND, A., LICHTENBERG, E., STAHL, B., VONSHAK, A. **Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways.** *Journal of Applied Phycology*, v. 2, n.3, p. 195-206, 1990.

RICHMOND, A. **Efficient utilization of high irradiance for production of photosutotrophic cell mass: a survey.** *Journal of applied Phycology*, v. 8, p. 381 – 387, 1996.

RICHMOND, A., CHENG-WU, Z. **Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of Nannochloropsis sp. outdoors.** *Journal of biotechnology*, v. 85, n. 3, p. 259 – 269, 2000.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology**. CRC press, 2004.

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

ROBERTIS, E. D. P. de; ZORN, T. M. T.; ROBERTIS, E. M. F.; OLIVEIRA, S. F.; VELLUTINI, W. C. **Bases da biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 307 p.

ROCHA, A. J. S. **Análise dinâmica de composições musicais.** Departamento de Engenharia Eletrotécnica, Instituto Superior do Porto, 2011. Dissertação (Mestrado)

ROSA, T. O.; LUZ, H. S. **Conceitos básicos de algoritmos genéticos: Teoria e Prática.** In: XI Encontro de Estudantes de Informática do Tocantins, Palmas, 2009.

ROSSO L., LOBRY J.R., BAJARD S., FLANDROIS J.P. **Convenient model to describe thecombined effects of temperature and pH on microbial growth.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 610–616, 1995.

SAÏDANE-BCHIR, F., EL FALLEH, A., GHABBAROU, E., HAMDI, M. **3rd generation bioethanol production from microalgae isolated from slaughterhouse wastewater.** *Waste and Biomass Valorization*, p. 1 – 6, 2016

SAMARAKOON, K. W., KO, J. Y., LEE, J. H., KWON, O. N., KIM, S. W., JEON, Y. J. **Apoptotic anticancer activity of a novel fatty alcohol ester isolated from cultured marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum.*** *Journal of functional foods*, v. 6, p. 231 – 240, 2014.

SAMBUSITI, C., BELLUCCI, M., ZABANIOTOU, A., BENEDUCE, L., MONLAU, F. **Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. *44*, p. 20 – 36, 2015.

SAMSON R., LEDUY A. **Multistage continuous cultivation of bluegreen alga *Spirulina maxima* in the flat tank photobioreactors with recycle.** *Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 65, p. 105–112, 1985.

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

SANDERS, R. W., PORTER, K. G., CARON, D. A. **Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*.** *Microbial Ecology*, v. 19, n. 1, p. 97–109, 1990.

SANTOS-BALLARDO, D. U., ROSSI, S., REYES-MORENO, C., VALDEZ-ORTIZ, A. **Microalgae potential as a biogas source: current status, restraints and future trends.** *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, p. 1 – 22, 2016.

SCHEUFELE, F. B., HINTERHOLZ, C. L., ZAHARIEVA, M. M., NAJDENSKI, H. M., MÓDENES, A. N., TRIGUEROS, D. E. G., BORBA, C. E., ESPINOZA-QUIÑONES, F. R., KROUMOV, A. D. **Complex mathematical analysis of photobioreactor system.** *Engineering in Life Sciences*. DOI: 10.1002/elsc.201800044.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., v. 02, p. 277-331, 2001.

SCHWARZ, M.P., TURNER, W.J. **Applicability of the Standard k-ε Turbulence Model to Gas-stirred Baths.** *Applied Mathematical Modelling*, v. 12, p. 273–279, 1988.

SETLIK I., KOMAREK J., PROKES B. **Short account of the activities from 1960 to 1965.** In: NECAS J., LHOTSKY O. (eds) **Annual report of the Laboratory of Experimental Algology and Department of Applied Algology for the year 1966.** Knihtisk, Prague, pp 5–36, 1967.

SHARMA, A. K., SAHOO, P. K., SINGHAL, S., & JOSHI, G. **Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*.** *Bioresource Technology*, 2016.

SHEEHAN, J., DUNAHAY, T., BENEMANN, J., ROESSLER, P**. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae.** US Department of Energy's, Office of Fuels development. NREL/TP-580-24190, 1998. 328 p.

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment**. England: John Wiley & Sons, LTD, 2005.

SILVA, F. C., PEREIRA, A., CANOZZI, M. B., ARAÚJO, S. C. **Cultivo de microalgas marinhas.** Em: POLI, C. R., POLI, A. T., ANDRATTA, E., BELTRAME, E. **Aquicultura Experiências Brasileira.** Florianópolis, SC. Multitarefa Editora Ltda, CDD: 639,30981, 2004.

SIMAS-RODRIGUES, C., VILLELA, H. D., MARTINS, A. P., MARQUES, L. G., COLEPICOLO, P., TONON, A. P. **Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol.** *Journal of experimental botany*, v. 130, 2015.

SILVA F. C., PEREIRA, A., CANOZZI, M. B., ARAÚJO, S. C. **Cultivo de microalgas marinhas.** Em: POLI, C.R., POLI, A. T. B., ANDREATA, E., BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura: experiencias brasileiras**, Florianópolis, Multitrefa, Editora Ltda, p. 93 – 120, 2003.

SILVA-BENAVIDES, A. M., TORZILLO, G. **Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures.** *Journal of Applied Phycology*, v. 24, p. 267 – 276, 2012.

SKJÅNES, K., REBOURS, C., & LINDBLAD, P. (2013). **Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process.** *Critical reviews in biotechnology*, v. 33, n. 2, p. 172 – 215, 2013.

SMACHETTI, M. E. S., RIZZA, L. S., CORONEL, C. D., DO NASCIMENTO, M., CURATTI, L. **Microalgal Biomass as an Alternative Source of Sugars for the Production of Bioethanol.** *Principles and Applications of Fermentation Technology*, p. 351-386, 2018.

SOKOLICHIN, A., EIGENBERGER, G., LAPIN, A. **Simulation of buoyancy driven bubbly flow: established simplifications and open questions.** *AIChE Journal*, v. 50, n. 1, p. 24-45, 2004.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. **Review: commercial application of microalgae.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 10, n. 2, p. 98 – 96, 2006.

STANIER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., COHEN-BAZIRE, G. **Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*).** *Bacteriological reviews*, v. 35, *n.* 2, p. 171, 1971.

STUDLEY, A., BATTAGLIA, F. **CFD Analyses of the Mixing Characteristics in Bubble Columns and Airlift Reactors.** In: ASME 2011 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. American Society of Mechanical Engineers, 2011. p. 507-516.

SU, Z., KANG, R., SHI, S., CONG, W., CAI, Z. **Study on the destabilization mixing in the flat plate photobioreactor by means of CFD.** *Biomass and bioenergy*, v. 34, n. 12, p. 1879-1884, 2010.

SUN, Y., HUANG, Y., LIAO, Q., FU, Q., ZHU, X. **Enhancement of microalgae production by embedding hollow light guides to a flat-plate photobioreactor.** *Bioresource Technology*, v. 207, p. 31–38, 2016.

TAMBURIC, B., ZEMICHAEL, F. W., CRUDGE, P., MAITLAND, G. C., HELLGARDT, K. **Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production.** *International journal of hydrogen energy*, v. 36, n. 11, p. 6578-6591, 2011.

TAMIYA, H., HASE, E., SHIBATA, K., MITUYA, A. **Kinetics of growth of chlorella with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature.** Em: BURLEW J. S. (Ed.), **Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant**, Carnegie Institution of Washington, Washington, 1953, pp. 204–232.

THEPENIER, C., GUDIN, C., & SARROBERT, B. *U.S. Patent No. 5,338,673*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 1994.

TORZILLO, G., SCOMA, A., FARALONI, C., GIANNELLI, L. **Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Critical reviews in biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 485 – 496, 2015.

TREDICI, M. R. Mass production of microalgae: photobioreactors. Em: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology**. CRC press, p. 178-214, 2004.

TREDICI, M. R. Photobi**ology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution.** *Future Science*, 2010.

TREDICI, M. R., CARLOZZI, P., ZITTELLI, G. C., MATERASSI, R. **A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria.** *Bioresource Technology*, v. 38, n.2-3, p. 153-159, 1991.

TREDICI, M. R., MATERASSI, R. **From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms.** *Journal of Applied Phycology*, v. 4, n. 3, p. 221-231, 1992.

TREDICI, M. R., ZITTELLI, G. C. **Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 57, p. 187 – 97, 1998.

TUDOR, R.; LAVRIC, V. **Optimization of total networks of water-using and treatment units by genetic algorithms.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 35, p. 2853-2866, 2011.

TUDOR, R.; LAVRIC, V. **Dual-objective optimization of integrated waster/wastewater networks.** *Computers & Chemical Engineering*, v. 35, p. 2853-2866, 2011.

UGWU, C. U., OGBONNA, J. C., TANAKA, H. **Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 600 – 607, 2002.

VANDAMME, D., FOUBERT, I., FRAEYE, I., MEESSCHAERT, B., MUYLAERT, K. **Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications.** *Bioresource Technology*, v. 105, p. 114 – 119, 2012.

VASUMATHI, K. K., PREMALATHA, M., SUBRAMANIAN, P. **Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalggae.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* v. 16, p. 5443 – 5450, 2012.

VIÊGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga Chlorella pyrenoidosa visando à produção de ésteres graxos**. Universidade Federal do Rio Grande, 2010. Dissertação (Mestrado).

VON BERTALANFFY, L. **General system theory.** New York, v. 41973, n. 1968, p. 40, 1968.

VON BERTALANFFY, L. **General system theory. Foundations, developments, applications.** Braziller, New York, 1969a.

VON BERTALANFFY, L. **General systems theory and psychiatry—an overview**. *General systems theory and psychiatry*, v. 32, n. 4, p. 33-46, 1969b.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology**. CRC Press, 1997.

VONSHAK, A., TORZILLO, G. **Environmental stress physiology.** In RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. England: Blackwell Publishing, 2004. p. 57-82.

WANG, W., HAN, F., LI, Y., WU, Y., WANG, J., PAN, R., SHEN, G. **Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors.** *Bioresource Technology*, v. 170, p. 395–403, 2014.

WILCOX, D.C. **Turbulence Modeling for CFD**, 3rd ed., DCW Industries, 2006.

XIA, A., HU, Z., LIAO, Q., HUANG, Y., ZHU, X., YE, W., SUN, Y. **Enhancement of CO_2 transfer and microalgae growth by perforated inverted arc trough internals in a flat-plate photobioreactor.** *Bioresource technology*, 2018.

YANO, T., KOGA, S**. Dynamic behavior of the chemostat subject to substrate inhibition.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.11, p.139-153, 1969.

ZENG, X., DANQUAH, M. K., CHEN, X. D., LU, Y. **Microalgaebioengineering: From CO2 fixation to biofuel production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 3252 - 3260, 2011.

ZGUROVSKY, M. Z., PANKRATOVA, N. D. **System analysis: Theory and applications.** *Springer Science & Business Media*, 2007.

ZHANG, K., KURANO, N., MIYACHI, S. **Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor.** *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 25, n. 2, p. 97-101, 2002.

ZHANG, Q. H., WU, X., XUE, S. Z., WANG, Z. H., YAN, C. H., CONG, W. **Hydrodynamic characteristics and microalgae cultivation in a novel flat-plate photobioreactor.** *Biotechnology progress*, v. 29, n. 1, p. 127-134, 2013.

ZHAO, B., ZHANG, Y., XIONG, K., ZHANG, Z., HAO, X., LIU, T. **Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO_2 fixation.** *Chemical Engineering Research and Design,* v. 89, p. 1758 – 1762, 2011.

Apêndice A – curva de correlação da absorbância

Os perfis de varredura da absorbância de culturas de microalgas em diferentes concentrações são apresentados na Figura A.1, abrangendo de 500 a 800 nm. A partir destes resultados foi verificado que o pico ficou em 682 nm, comprimento de onda adotado para a determinação da concentração de biomassa.

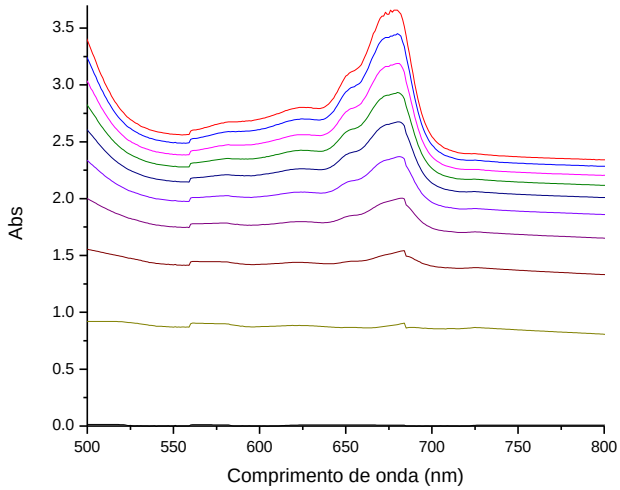

Figura A.1 – Espectros de varredura de suspensões da microalga utilizada

Foram realizadas diluições de uma suspensão de microalgas com concentração conhecida a fim de se determinar uma equação de correlação entre a concentração de biomassa e a absorbância da amostra (Figura A.2). A relação encontrada está apresentada na Equação A.1.

$$X(\text{g L}^{-1}) = 0{,}2578\text{Abs} - 0{,}00005 \qquad \text{(A.1)}$$

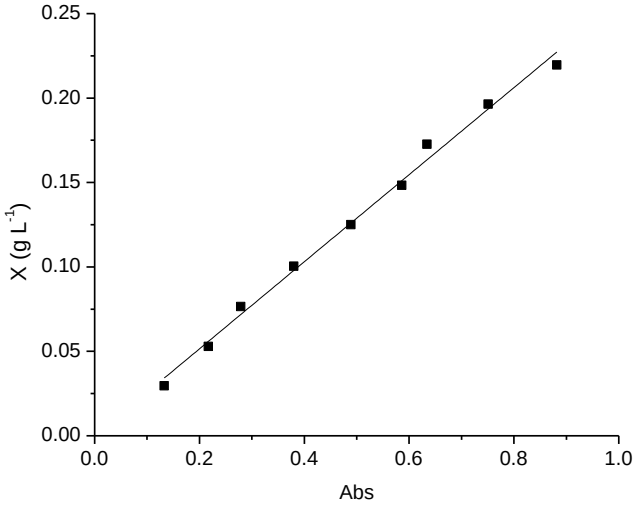

Figura A.2 – Curva de correlação entre a concentração da biomassa (g L^{-1}) e a absorbância em 682 nm

Anexo A – Identificação molecular da microalga

O procedimento de identificação molecular da microalga estudada neste trabalho foi realizado pelo grupo de pesquisa de Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

A.1 Metodologia

O processo de extração e purificação do DNA da amostra de microalga foi realizado conforme descrito por Romano (1998) e alternativamente utilizando o PowerSoil® DNA Isolation Kit, MO Bio. Depois de purificado, o DNA extraído foi precipitado com 10% de seu volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. A amplificação da região genômica 18S do rDNA foi realizada utilizando-se pares de primers universais (ZHANG *et al*., 2008; YUAN, *et al*., 2011; DEVI, *et al*., 2015).

No procedimento de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), foram utilizados 20 ng de DNA genômico, tampão 10X (20 mM Tris-HCL pH: 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl2, 0,4 μM de cada primer, 0,4 mM dNTP e 1 unidade Taq DNA Polymerase (Bioron®), em um termociclador Biocycler Modelo MJ96+. Inicialmente, foram aplicados 5 min a 95 °C para desnaturação do ADN, seguidos de 30 ciclos como segue:1 min a 95 °C para desnaturação; 1 min a 50 °C para recozimento de primers e 1 min a 72 °C para amplificação, seguidos de 10 minutos para amplificação final.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1x (89 mM Tris-base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM EDTA), visualizados por coloração com brometo de etídio (0,5 μg mL^{-1}) e fotografados sob luz UV (260 nm). O padrão de peso molecular de DNA 100 pb (Ludwig Biotec) foi utilizado para a determinação do tamanho do fragmento de DNA amplificado.

Os fragmentos amplificados foram purificados a partir de gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X, utilizando o PCR Purification Kit/Ludwig Company. Utilizou-se um total de 60 ng de produto da PCR para sequenciação em um equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequências nucleotídicas foram inicialmente editadas usando o software Bioedit versão 7.2.5 (HALL, 1999), e depois processado no Nucleotide BLAST (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia). As sequências

alinhadas foram submetidas à estimação de distância pelo método da distância-p e a árvore filogenética foi construída aplicando o Método do Grupo de Pareamento Unweighted em médias aritméticas (UPGMA) no software MEGA7 versão 7.0.18 (Kumar *et al.*, 2016).

A.2 Referências

DEVI, S.G., FATHIMA, A.A., RADHA, S., ARUNRAJ, R., CURTIS, W.R., RAMYA, M. **A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications**. PLoS One 10, 2015.

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucleic Acids Symp. Ser. 41 (1999) 95–98.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. **MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets**, *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

ROMANO, E. **Extração de DNA de tecidos vegetais**, em: Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C. (Eds.), **Manual de Transformação Genética de Plantas**, EMBRAPA-SPI, Brasília, p.163-177, 1998.

YUAN, C., LIU, J., FAN, Y., REN, X., HU, G., LI, F. **Mychonastes afer HSO-3-1 as a potential new source of biodiesel.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, p. 47, 2011.

ZHANG, J., HUSS, V.A.R., SUN, X., CHANG, K., PANG, D. **Morphology and phylogenetic position of a *trebouxiophycean* green alga (*Chlorophyta*) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species**. European Journal of Phycology, v. 43, p. 185–193, 2008.