

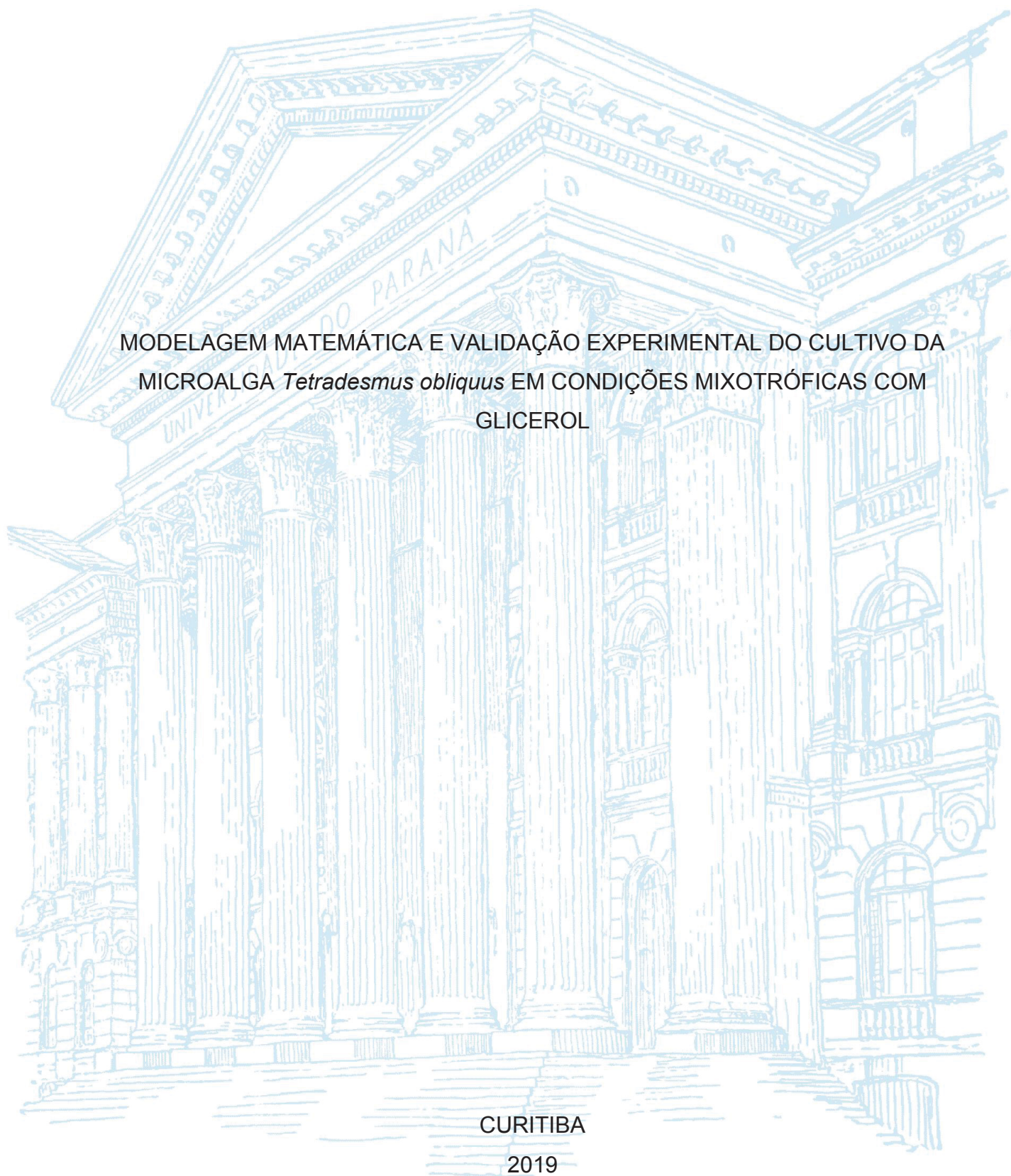
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA PAOLA DARIO

MODELAGEM MATEMÁTICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DO CULTIVO DA
MICROALGA *Tetrademus obliquus* EM CONDIÇÕES MIXOTRÓFICAS COM
GLICEROL

CURITIBA

2019



PRISCILA PAOLA DARIO

MODELAGEM MATEMÁTICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DO CULTIVO DA
MICROALGA *Tetradismus obliquus* EM CONDIÇÕES MIXOTRÓFICAS COM
GLICEROL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Coorientador: Dr. Wellington Balmant

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

| | |
|-------|--|
| D218m | <p>Dario, Priscila Paola Modelagem matemática e validação experimental do cultivo da microalga <i>tetrademus obliquus</i> em condições mixotróficas com glicerol [recurso eletrônico] / Priscila Paola Dario. – Curitiba, 2019.</p> <p>Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós- Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2019.</p> <p>Orientador: André Bellin Mariano. Coorientador: Luiz Pereira Ramos. Coorientador: Wellington Balmant.</p> <p>1. Microalga. 2. Biocombustíveis. 3. Biomassa. 4. Lipídeos. 5. Metabólitos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mariano, André Bellin. III. Ramos, Luiz Pereira. IV. Balmant, Wellington. V. Título.</p> <p>CDD: 662.88</p> |
|-------|--|

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DOS MATERIAIS - 40001016033P9

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de PRISCILA PAOLA DARIO intitulada: **MODELAGEM MATEMÁTICA E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DO CULTIVO DA MICROALGA *Tetrademus obliquus* EM CONDIÇÕES MIXOTRÓFICAS COM GLICEROL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Junho de 2019.


ANDRE BELLIN MARIANO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MAURA HARUMI SUGAI GUERIOS
Avaliador Externo (UP)


JOSE DIRCEU COELHO VARGAS
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico toda a pesquisa e a presente dissertação ao meu pai Jaime Antonio Dario, a minha mãe Tania Aparecida Santi e ao meu irmão Vitório Dario Neto. Essas pessoas são o alicerce dos meus dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sabedoria e discernimento nestes dois anos de aprendizagens e desafios.

Ao Professor Dr. André Bellin Mariano pela oportunidade de orientação e realização dos trabalhos paralelos a minha pesquisa, além da integração no Projeto de Extensão Ciência para Todos, que proporcionou o desenvolvimento de competências essenciais para minha formação docente.

Ao Professor Dr. Luiz Pereira Ramos pelo imensurável conhecimento, pela disponibilidade, pelo acolhimento no laboratório e principalmente por todos os ensinamentos que contribuem para o progresso da minha maturidade científica.

Ao Dr. Wellington Balmant por todo auxílio, amizade, conselhos, pela genialidade nas decisões referentes à pesquisa desenvolvida e por todas as discussões que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Dr. José Viriato Coelho Vargas pelo auxílio financeiro na obtenção dos materiais utilizados nesta pesquisa e por disponibilizar o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energias Renováveis (NPDEAS), o qual foi fundamental para realização dos experimentos.

Ainda, ao Professor Dr. Haroldo de Araújo Ponte, a Professora Dra. Maura Harumi Sugai Guérios e ao Professor Dr. José Viriato Coelho Vargas pelas contribuições na banca avaliadora da qualificação e defesa final deste trabalho.

Aos meus pais Jaime Antonio Dario e Tania Aparecida Santi e meu irmão Vitório Dario Neto, por estarem sempre presentes na minha história. Vocês são as pessoas que eu mais amo na vida.

Ao Luis Paulo Bettin Baldissera por toda paciência, amor, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Agradeço pelos curtos intervalos de tempo que compartilhamos nesses dois anos divididos entre estudo, nossas famílias e amigos. Você sempre é a minha melhor companhia, mesmo distante geograficamente.

A Rosane Aparecida Baldissera e ao Dirceu Baldissera por todo incentivo e ajuda nesses anos. Vocês são minha segunda família.

Ao meu tio Roque Santi por me acolher e me ajudar sem medir esforços quando cheguei em Curitiba para fazer o mestrado. Muito obrigada por tudo Padrinho.

A Katiane de Moraes Gasperin, minha amiga de longa data, por todo apoio, pelos conselhos e por toda a parceria no desenvolvimento dos trabalhos. Muito bom sonhar contigo tudo o que a vida nos reserva.

A Elaine por sempre estar disposta a me ajudar com a parte burocrática e pelas boas conversas. É uma das pessoas mais competentes que eu conheço.

A Beatriz pelo aprendizado, amizade e por ser alguém muito especial na minha trajetória, foi com ela que aprendi quase tudo o que sei sobre esses microrganismos fascinantes que são as microalgas.

Aos meus amigos do coração que conheci nesses últimos dois anos: Daniela Yumi Sugai, Nyelson da Silva Nonato, Matias Nicolas Muñoz, Johana Guadalupe Blanco Martinez, Leonardo Cavalheiro Martinez, Fabiana Rosa de Lirio, Heloisa Roberto Pinheiro da Silva, Ana Luiza Mendes, Giuliana Pavaneli e Rafael Duarte de Lima. Vocês são pessoas incríveis, as quais eu tenho um carinho imenso. Muito obrigada pelos bons dias e aqueles difíceis que estiveram ao meu lado!

Ao Thiago Nishimura e a Helena Bacarense por todo o auxílio nas atividades do laboratório, pela parceria nos cultivos, incluindo os finais de semana.

Aos meus professores da Universidade Federal da Fronteira Sul, fundamentais para meus primeiros passos na área acadêmica, os quais tenho grande carinho. Em especial, ao Professor Dr. Carlos Alberto Cecatto pelos ensinamentos que forneceram as ferramentas necessárias para cursar o mestrado na área de engenharia e realizar o modelo matemático deste trabalho. Agradeço por todas as vezes que me esclareceu às dúvidas de cálculo às 7 h da manhã na Universidade. Ao Professor Dr. André Lazarin Gallina, por todo o aprendizado sobre energias renováveis, conselhos e por estar sempre disposto a ajudar. Por tudo o que vocês e todos os meus professores contribuíram na minha trajetória, estou concluindo mais essa etapa da minha formação. A vocês minha gratidão eterna.

A todos que me auxiliaram de alguma maneira no período que estive no NPDEAS e também no Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ). Muito obrigada.

Ao coordenador Professor Carlos Augusto Dartora do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, pelo direcionamento e atenção quanto aos assuntos relacionados ao mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pelo financiamento indispensável para minha permanência em Curitiba e
desenvolvimento da pesquisa.

O meu muito obrigada à todos(as).

“A fé é a certeza daquilo que esperamos e a prova das coisas que não vemos.”

(Hebreus 11:1)

RESUMO

Em consequência das variáveis que influenciam no desenvolvimento das microalgas, é interessante a utilização de modelos matemáticos com a capacidade de prever o crescimento, acúmulo de biomassa e metabólitos. Nesta perspectiva, o objetivo do presente trabalho consistiu na elaboração de dois modelos matemáticos simplificados a partir do metabolismo central baseados na equação de Monod, para descrever o acúmulo de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas totais na microalga *Tetradismus obliquus*. Os modelos foram desenvolvidos utilizando os dados obtidos através dos experimentos em escala laboratorial, realizados em condições foto autotróficas e mixotróficas. Para este último, a fonte de carbono orgânica utilizada foi o glicerol na concentração de 5 g.L⁻¹, devido ao seu baixo custo e disponibilidade na cadeia de produção de biodiesel no Brasil. Os inóculos com concentração inicial de 0,1881 ± 0,0056 g.L⁻¹, foram avaliados em relação à produtividade de biomassa seca, carboidratos, lipídeos, proteínas totais, pH, absorvância do cultivo e concentração celular. A adição do glicerol provocou a maior produtividade da biomassa e das macromoléculas entre o 3º e o 6º dia de cultivo, correspondendo a 0,0976 ± 0,0046 g.L⁻¹.d⁻¹ de biomassa, 0,0266 ± 0,0004 g.L⁻¹.d⁻¹ de carboidratos totais, 0,0144 ± 0,0033 g.L⁻¹.d⁻¹ de lipídeos totais e 0,0309 ± 0,0017 g.L⁻¹.d⁻¹ de proteínas totais, com relação aos outros dias e a condição com a ausência de glicerol. Além disso, foi observado no experimento mixotrófico que as microalgas atingiram a fase estacionária no intervalo dos dias 3 e 6, enquanto na condição foto autotrófica esse comportamento não foi verificado durante o período cultivado. O primeiro modelo matemático considerou a hipótese logística e o segundo a formação do composto de inibição. Para resolução dos códigos computacionais, foi utilizado o software MATLAB®, o método Nelder-Mead, a rotina Fminsearch e a subrotina ode23s. As simulações demonstraram baixo tempo computacional, aproximadamente 4 segundos. O erro quadrado normalizado foi próximo de 0,2 e 0,3 para o modelo do fator logístico e o modelo de inibição, respectivamente. A partir do modelo do fator logístico foi possível descrever o comportamento das microalgas para a condição de cultivo determinada, enfatizando a ferramenta da modelagem como método promissor na previsão dos fenômenos.

Palavras-chave: Microalgas. Cultivo mixotrófico. Modelagem matemática. Validação experimental.

ABSTRACT

As a result of the variables that influence the microalgae development, it is interesting to use mathematical models with the ability to predict growth, biomass accumulation and metabolites. Thus, the objective of the present work was the elaboration of two simplified mathematical models based on the central metabolism using the Monod equation, to describe the accumulation of biomass, carbohydrates, lipids and total proteins in the *Tetradesmus obliquus* microalgae. The models were developed using data obtained through laboratory scale experiments, performed under photo autotrophic and mixotrophic conditions. For the latter, the source of organic carbon used was glycerol at a concentration of 5 g.L⁻¹, due to its low cost and availability in the biodiesel production chain in Brazil. Inocula with initial concentration of 0.1881 ± 0.0056 g.L⁻¹ were evaluated for productivity of dry biomass, carbohydrates, lipids, total proteins, pH, culture absorbance and cell concentration. The addition of glycerol caused the highest productivity of biomass and macromolecules between the 3rd and 6th day of cultivation, corresponding to 0.0976 ± 0.0046 g.L⁻¹.d⁻¹ biomass, 0.0266 ± 0.0004 g.L⁻¹.d⁻¹ total carbohydrates, 0.0144 ± 0.0033 g.L⁻¹.d⁻¹ total lipids and 0.0309 ± 0.0017 g.L⁻¹.d⁻¹ total proteins, relative to the others days and the condition with the absence of glycerol. Furthermore, it was observed in the mixotrophic experiment that microalgae reached the stationary phase in the days 3 and 6, while in the photo autotrophic condition this behavior was not verified during the cultivated period. The first mathematical model considered the logistic hypothesis and the second the formation of the inhibition compound. For computational code resolution, the MATLAB[®] software, the Nelder-Mead method, the Fminsearch routine and the ode23s subroutine were used. The simulations demonstrated low computational time, approximately 4 seconds. The normalized square error was close to 0.2 and 0.3 for the logistic factor model and the inhibition model, respectively. From the logistic factor model it was possible to describe the behavior of microalgae for the determined cultivation condition, emphasizing the modeling tool as a promising method for predicting the phenomena.

Keywords: Microalgae. Mixotrophic cultivation. Mathematical modeling. Experimental Validation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - LINHAS DE PESQUISA EM DESENVOLVIMENTO NO NPDEAS..... | 23 |
| Figura 2 - POSSIBILIDADE DE APLICAÇÃO DA PRESENTE PESQUISA NAS ROTAS DE OBTENÇÃO DE BIODIESEL E BIOETANOL SUSTENTÁVEL..... | 25 |
| Figura 3 - POSSÍVEIS APLICAÇÕES DA BIOMASSA DE MICROALGAS EM DIVERSOS SETORES TECNOLÓGICOS..... | 26 |
| Figura 4 - CONTEXTO DE SUSTENTABILIDADE E BIORREFINARIA..... | 31 |
| Figura 5 – ESQUEMA PARA FORMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO DE UM SISTEMA | 44 |
| Figura 6 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA MICROALGA DA ESPÉCIE <i>Tetradismus obliquus</i> | 50 |
| Figura 7 – PRIMEIRO DIA DE CULTIVO DO INÓCULO | 52 |
| Figura 8 – EQUIPAMENTO JAR TEST UTILIZADO NA FLOCULAÇÃO E CULTIVO FLOCULADO | 53 |
| Figura 9 – PROCEDIMENTO PARA RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA | 53 |
| Figura 10 – BIOMASSA OBTIDA NO CULTIVO DA MICROALGA <i>Tetradismus</i> <i>obliquus</i> EM LABORATÓRIO..... | 54 |
| Figura 11 – ESQUEMA UTILIZANDO DESSECADOR COM SILICA E BALANÇA ANALÍTICA PARA OBTENÇÃO DA BIOMASSA SECA | 55 |
| Figura 12 – MECANISMO DE ACÚMULO DAS MACROMOLÉCULAS E BIOMASSA NA CÉLULA | 58 |
| Figura 13 – MECANISMO DE ACÚMULO DAS MACROMOLÉCULAS E DA BIOMASSA NA CÉLULA | 63 |
| Figura 14 - BIOMASSA SECA COLETADA DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO | 72 |
| Figura 15 – NÚMERO DE CELULAS COLETADAS DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO | 73 |
| Figura 16 - CRESCIMENTO DO CULTIVO MIXOTRÓFICO EM PLACA DE PETRI | 74 |
| Figura 17 – VALORES DA ABSORBÂNCIA DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO | 75 |
| Figura 18 – VALORES DO pH COLETADOS DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Figura 19 - CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, LÍPIDEOS E PROTEÍNAS TOTAIS NA MICROALGA..... | 77 |
| Figura 20 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CABOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS. | 80 |
| Figura 21 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CABOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS..... | 81 |
| Figura 22 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CABOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS..... | 84 |
| Figura 23 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CABOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS. | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – COMPOSIÇÃO GERAL DA BIOMASSA DE MICROALGAS E PRINCIPAIS ELEMENTOS QUE CONSTITUEM CADA METABÓLITO | 28 |
| Tabela 2 – CULTIVOS DE MICROALGAS NA LITERATURA UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO GLICEROL | 35 |
| Tabela 3- CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS BIOCOMBUSTÍVEIS: VANTAGENS E DESVANTAGENS..... | 38 |
| Tabela 4 - ESTADO DA ARTE: MODELAGEM MATEMÁTICA DE ACÚMULO DE BIOMASSA E METABÓLITOS..... | 45 |
| Tabela 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO CHU UTILIZADO PARA CULTIVO DA MICROALGA <i>Tetrademus obliquus</i> EM CONDIÇÕES CONTROLADAS..... | 51 |
| Tabela 6 - CONDIÇÕES INICIAIS DOS COMPONENTES CONSIDERADOS NO MODELO..... | 68 |
| Tabela 7 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A SIMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO. | 69 |
| Tabela 8 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A SIMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO. | 70 |
| Tabela 9 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E MACROMOLÉCULAS NO MEIO FOTO AUTOTRÓFICO | 78 |
| Tabela 10 – VALORES DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS DO CULTIVO MIXOTRÓFICO. | 79 |
| Tabela 11 – VALORES DOS PARÂMETROS ENCONTRADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO..... | 80 |
| Tabela 12 – VALORES DOS PARÂMETROS ENCONTRADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO..... | 83 |

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

| | |
|--------|--|
| DO | Densidade óptica |
| NPDEAS | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-sustentável |
| NREL | National Renewable Energy Laboratory |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | | |
|-------------|---|-----------------------|
| b_i | Concentração biomassa inicial | $(g.L^{-1})$ |
| b_f | Concentração biomassa final | $(g.L^{-1})$ |
| B_s | Concentração biomassa seca | $(g.L^{-1})$ |
| C_{gli} | Concentração do glicerol | $(g.L^{-1})$ |
| CO_2 | Dióxido de carbono | |
| CO_3^{2-} | Carbonato | |
| $[CO_2]^*$ | Concentração de equilíbrio do ar injetado | $(g.L^{-1})$ |
| $[CO_2]$ | Concentração de CO_2 no meio líquido | $(g.L^{-1})$ |
| F_{log} | Fator logístico | |
| HCl | Ácido clorídrico | |
| H_{CO_2} | Constante de Henry | $(g.L^{-1}.atm^{-1})$ |
| HCO_3^- | Bicarbonato | |
| I | Concentração do composto inibidor gerado a partir do glicerol | $(g.L^{-1})$ |
| K_{carb} | Constante de saturação da produção de carboidratos | $(g.L^{-1})$ |
| K_{CO_2} | Constante de saturação do CO_2 | $(g.L^{-1})$ |
| K_{gli} | Constante de saturação da absorção de glicerol | $(g.L^{-1})$ |
| K_{ig1} | Constante de inibição da fotossíntese pelo composto I | $(g.L^{-1})$ |
| K_{ig2} | Constante de inibição da absorção do glicerol pelo composto I | $(g.L^{-1})$ |
| K_{ig3} | Constante de inibição da síntese de lipídeos pelo composto I | $(g.L^{-1})$ |
| K_{ig4} | Constante de inibição da síntese de carboidratos pelo composto I | $(g.L^{-1})$ |
| K_{ig5} | Constante de inibição da síntese de proteínas pelo composto I | $(g.L^{-1})$ |
| K_i | Constante de saturação da produção do composto I | $(g.L^{-1})$ |
| K_{lip} | Constante de saturação da produção de lipídeos | $(g.L^{-1})$ |
| K_{prot} | Constante de saturação do efeito do P_C na produção de proteína | $(g.L^{-1})$ |
| K_{la} | Coeficiente de transferência de massa do CO_2 do ar para o meio | (dia^{-1}) |
| K_{NH_3} | Constante de saturação do efeito da amônia na produção de | $(g.L^{-1})$ |

| | | |
|-------------------|---|---|
| | proteína | |
| m_1 | Peso seco da membrana | (g) |
| m_2 | Peso seco da membrana mais biomassa | (g) |
| N | Concentração de nitrogênio | (g.L ⁻¹) |
| $NaOH$ | Hidróxido de sódio | |
| O_2 | Oxigênio | |
| P_b | Produtividade de biomassa | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| P_c | Intermediários de carbono | (g.L ⁻¹) |
| P_{carb} | Produtividade de carboidratos totais | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| P_{CO_2} | Pressão parcial de CO ₂ no ar | atm |
| P_{lip} | Produtividade de lipídios totais | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| P_{prot} | Produtividade de proteínas totais | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| r_{carb} | Velocidade de formação dos carboidratos | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| r_{foto} | Velocidade da fotossíntese | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| r_{gli} | Velocidade de absorção do glicerol | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| r_i | Velocidade de produção do composto I | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| r_{lip} | Velocidade de formação dos lipídeos | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| r_{prot} | Velocidade de formação das proteínas | (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
| T_n | Taxa de inibição pelo composto i | |
| V_f | Volume do cultivo | (mL) |
| Y_x | Coeficiente de rendimento da biomassa | (g.g ⁻¹) |
| Y_{C_{gli}/P_c} | Coeficiente de rendimento do glicerol nos intermediários de carbono | (g.g ⁻¹) |
| Y_{CO_2/P_c} | Coeficiente de rendimento de CO ₂ para P _c | (g.g ⁻¹) |
| $Y_{N/[prot]}$ | Coeficiente de rendimento do nitrogênio em proteínas | (g.g ⁻¹) |
| $Y_{P_c/[carb]}$ | Coeficiente de rendimento dos P _c em carboidratos | (g.g ⁻¹) |
| $Y_{P_c/[lip]}$ | Coeficiente de rendimento dos P _c em lipídios | (g.g ⁻¹) |
| $Y_{P_c/[prot]}$ | Coeficiente de rendimento dos P _c em proteínas | (g.g ⁻¹) |
| X | Concentração de biomassa | |
| X_{cf} | Teor de carboidratos final | (% m/m) |
| X_{ci} | Teor de carboidratos no dia zero | (% m/m) |

| | | |
|---------------|---|----------------------|
| X_{lf} | Teor de lipídeos final | (% m/m) |
| X_{li} | Teor de lipídeos no dia zero | (% m/m) |
| X_{pf} | Teor de proteínas final | (% m/m) |
| X_{pi} | Teor de proteínas no dia zero | (% m/m) |
| $X_{máxmix}$ | Concentração máxima de biomassa do cultivo mixotrófico | (g.L ⁻¹) |
| $X_{maxfoto}$ | Concentração máxima de biomassa do cultivo foto autotrófico | (g.L ⁻¹) |

SIMBOLOS GREGOS

| | | |
|---------------------|--|----------------------|
| μ_{carb} | Velocidade específica máxima da produção de carboidratos | (dia ⁻¹) |
| μ_{foto} | Velocidade específica máxima da fotossíntese | (dia ⁻¹) |
| μ_{gli} | Velocidade específica máxima da absorção de glicerol | (dia ⁻¹) |
| μ_i | Velocidade específica máxima da produção do composto I | (dia ⁻¹) |
| μ_{lip} | Velocidade específica máxima da produção de lipídios | (dia ⁻¹) |
| μ_{prot} | Velocidade específica máxima da produção de proteínas | (dia ⁻¹) |
| Δt | Variação do tempo | dias |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 26 |
| 2.1 MICROALGAS | 26 |
| 2.1.1 Sistemas e tipos de cultivo | 27 |
| 2.1.2 Composição e nutrientes fundamentais para o desenvolvimento | 28 |
| 2.1.3 Lipídeos e carboidratos: componentes na célula das microalgas | 29 |
| 2.2 MICROALGAS: BIOMASSA POTENCIAL COMO MATÉRIA PRIMA | 31 |
| 2.1.4 Fatores que influenciam no desenvolvimento do cultivo e metodologias para enriquecimento nutricional..... | 32 |
| 2.3 BIOCOMBUSTÍVEIS COMO ALTERNATIVA AOS COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS..... | 38 |
| 2.2.1 Etanol | 39 |
| 2.2.2 Biodiesel..... | 41 |
| 2.4 MODELAGEM MATEMÁTICA..... | 42 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 48 |
| 4 OBJETIVOS | 49 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL | 49 |
| 4.1.1 Objetivos específicos..... | 49 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 50 |
| 5.1 OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS | 50 |
| 5.1.1 Origem da microalga <i>Tetradismus obliquus</i> e condições de cultivo do inóculo inicial | 50 |
| 5.1.2 Avaliação da contaminação no meio cultivo | 51 |
| 5.1.3 Condições de cultivo e obtenção da biomassa nas diferentes fases do crescimento | 52 |
| 5.1.3 Descrição das análises do meio de cultivo | 54 |
| 5.1.3.1 pH, absorvância, contagem celular e biomassa seca | 54 |
| 5.1.4 Análises da composição das microalgas..... | 55 |
| 5.1.4.1 Carboidratos totais | 55 |
| 5.1.4.2 Lipídios totais | 56 |
| 5.1.4.3 Proteínas totais | 56 |
| 5.1.4 Cálculo da produtividade de biomassa e metabólitos | 57 |
| 5.2 MODELO MATEMÁTICO | 58 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.2.1 | Elaboração da modelagem matemática utilizando a hipótese logística | 58 |
| 5.2.1.1 | Equações diferenciais..... | 61 |
| 5.2.2 | Elaboração da modelagem matemática utilizando a hipótese da inibição pelo glicerol | 63 |
| 5.2.2.1 | Equações diferenciais do modelo..... | 66 |
| 5.3 | CONDIÇÕES INICIAIS DO MODELO MATEMÁTICO | 68 |
| 5.4 | AJUSTE DOS MODELOS MATEMÁTICOS E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DO MODELO DA HIPÓTESE LOGÍSTICA..... | 68 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 71 |
| 6.1 | DADOS EXPERIMENTAIS DOS CULTIVOS | 71 |
| 6.2 | ANÁLISE DA BIOMASSA: ACÚMULO DE METABÓLITOS E PRODUTIVIDADE | |
| | 76 | |
| 6.3 | MODELOS MATEMÁTICOS | 79 |
| 6.3.1 | Hipótese logística: Ajuste e validação experimental..... | 79 |
| 6.3.2 | Hipótese da formação do composto I: ajuste dos parâmetros..... | 83 |
| 6.4 | DISCUSSÃO SOBRE OS MODELOS MATEMÁTICOS..... | 86 |
| 7 | CONCLUSÃO | 87 |
| 8 | SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS..... | 88 |
| 9 | REFERÊNCIAS..... | 90 |

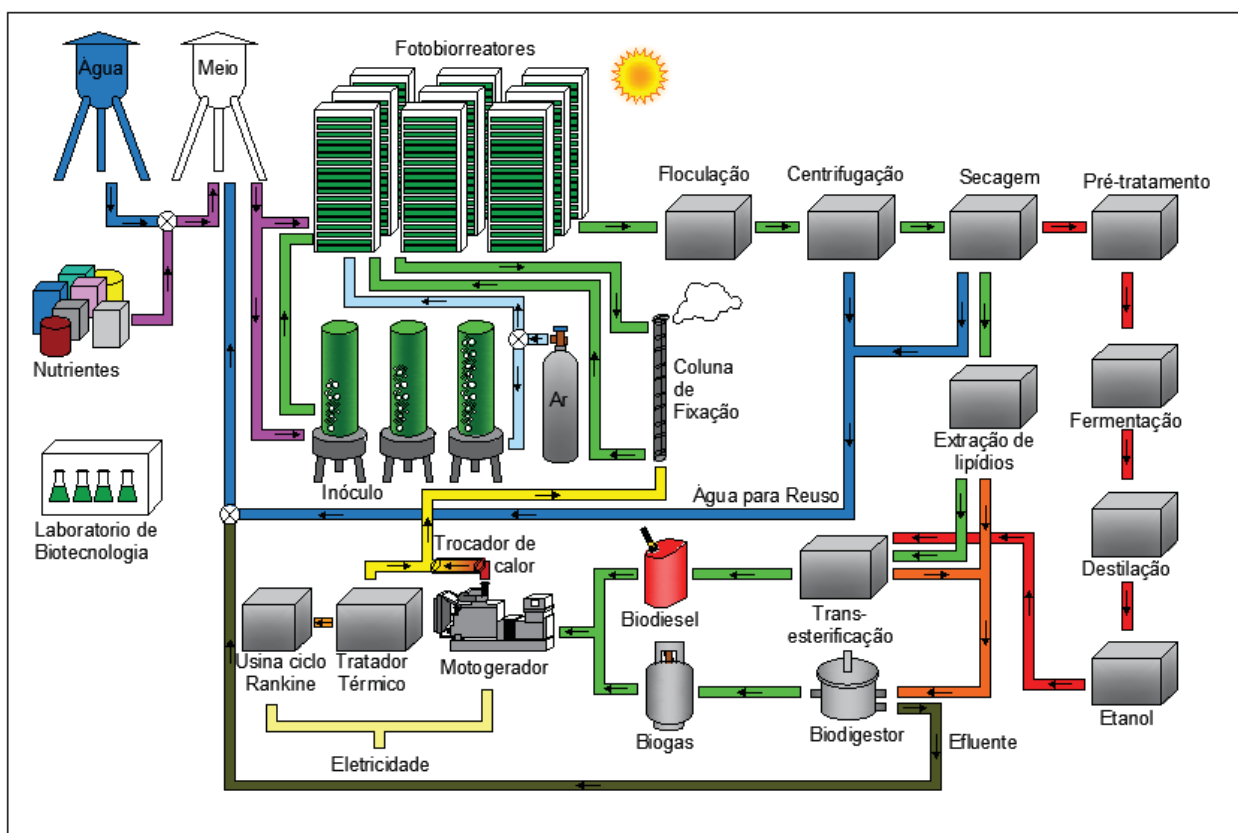
1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis apresentam-se promissores com relação aos combustíveis fósseis, pois além de serem renováveis possuem o ciclo do carbono parcialmente fechado devido a realização da fotossíntese das plantas utilizadas como substrato (DARDA; PAPALAS; ZABANIOTOU, 2019). Nesta perspectiva, as microalgas possuem um crescente mercado pela rápida capacidade de multiplicação (FANG; YEH; LIU, 2018). O desafio de obter alta produtividade de metabólitos nas cepas considera mecanismos como temperatura, adição de íons metálicos, inibição de nitrogênio, fósforo, adição de carbono, potencial hidrogeniônico (pH) e estresse salino, que interferem além do acúmulo de biomassa e metabólitos (SAJJADI et al. 2018) no desenvolvimento do cultivo, podendo influenciar na divisão celular e no aumento da concentração de biomassa (ZHAN; RONG; WANG, 2017).

A destinação da biomassa destes microrganismos permite que o meio de cultura seja manipulado para aplicações específicas, tornando interessante a utilização de coprodutos industriais. Devido ao aumento da produção de biodiesel em consequência das novas políticas do seu emprego no Brasil (BRASIL, 2018), é possível constatar uma maior geração de coprodutos do processo, sendo um destes a glicerina (THOAI et al., 2017), que pode ser utilizada como fonte de carbono orgânico para o cultivo de microalgas em meio mixotrófico (MORAIS et al., 2019). No contexto do estudo da utilização de microalgas aplicadas para a produção de energias renováveis, o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), localizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), realiza pesquisas que apresentam como objetivo aprimorar o cultivo em larga escala através de fotobiorreatores compactos.

O prédio cultiva microalgas utilizando dejetos suíno biodigerido como nutrientes para estes microrganismos e em consequência das elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo no substrato do meio (TAHER, 2013), a biomassa obtida apresenta altos teores de proteínas, pois o excesso dos dois compostos mencionados em relação à quantidade de carbono tem como consequência uma maior formação proteica na microalga (FERNANDES et al., 2016). A Figura 1 apresenta as áreas temáticas com pesquisas em andamento no laboratório, relacionadas a estes microrganismos.

Figura 1 - LINHAS DE PESQUISA EM DESENVOLVIMENTO NO NPDEAS.



FONTE: Satyanarayana, Mariano e Vargas (2011), adaptado.

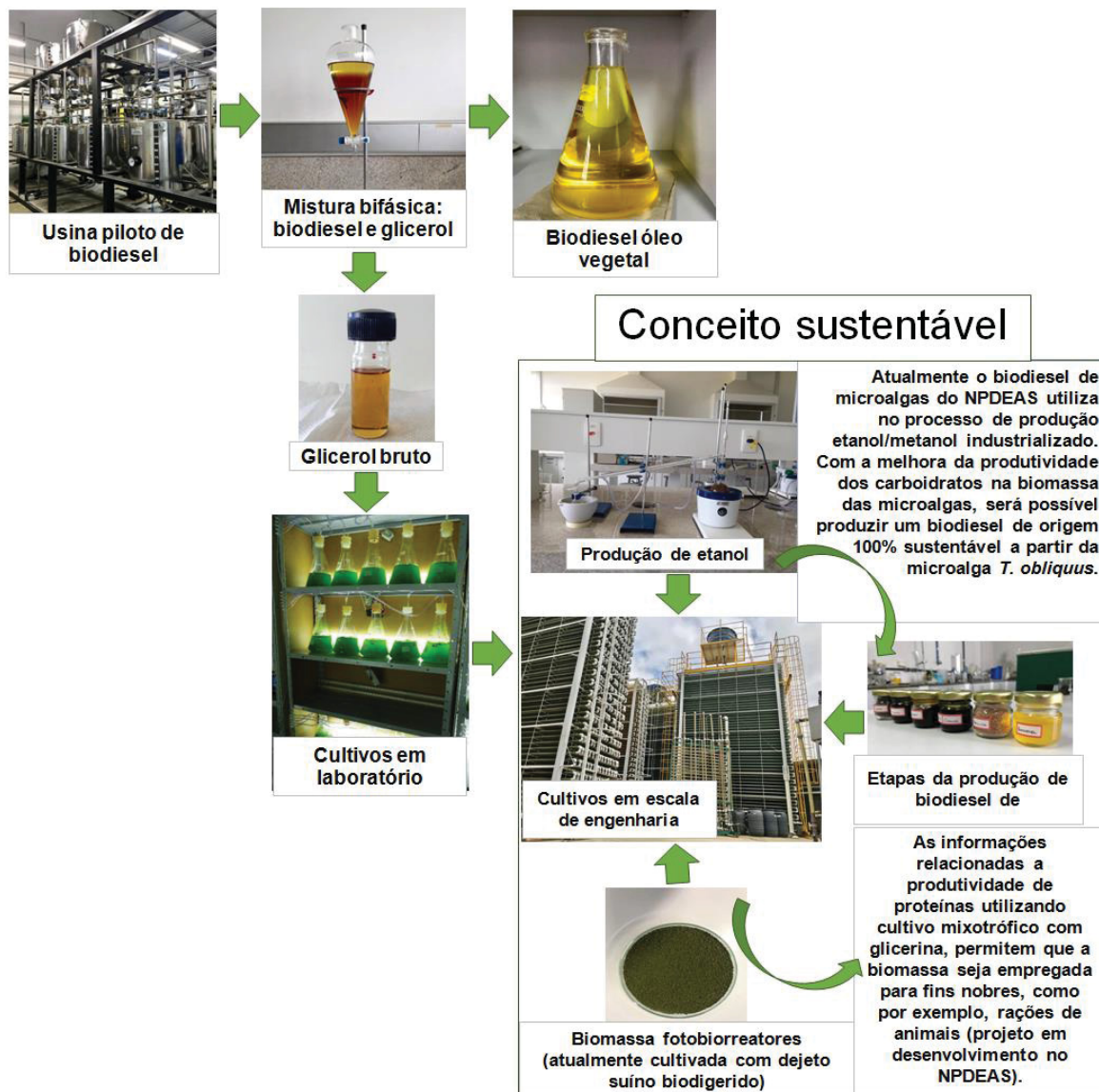
Atualmente, dentre as destinações da biomassa é incluída a produção do biodiesel de terceira geração, que consiste na extração dos lipídeos da microalga utilizando solvente orgânico e após, é realizada a saponificação utilizando hidróxido de sódio (NaOH), seguida da esterificação empregando ácido clorídrico (HCl) (FANG; YEH; LIU, 2018). O mosto gerado apresenta baixo teor lipídico e no conceito de biorrefinaria, que segundo o National Renewable Energy Laboratory (NREL, 2018), é definida como a conversão de biomassa em produtos químicos, energia e combustível realizando a integração de processos e equipamentos (PANDEY et al., 2015), é interessante a utilização da biomassa residual para fermentação simultânea e desta maneira obter como produto o etanol. Dentre as vantagens, o tratamento com solventes na etapa de extração lipídica contribui na quebra da parede celular e não interfere no amido presente, sendo reduzidos o custo e o tempo de pré tratamento da biomassa para obtenção dos monômeros que serão utilizados na fermentação (CHNG; CHAN; LEE, 2016). Assim sendo, para ocorrer uma economia

circular na produção de etanol de terceira geração, é necessário o aumento de carboidratos na biomassa da microalga e uma das alternativas é o enriquecimento nutricional, podendo substituir parcial ou totalmente o dejetos suíno biodigerido pelo glicerol.

Portanto, foi realizado o cultivo mixotrófico com glicerina para verificar o aumento de carboidratos e lipídeos na espécie *Tetradesmus obliquus* anteriormente conhecida como *Scenedesmus obliquus* (NADZIR et al., 2019; PANCHA et al., 2014). De acordo com a literatura, a porcentagem de carboidratos, lipídeos e proteínas nesta microalga possui composição variada entre os valores na faixa de 10 a 17% de carboidratos, 12 a 14% de lipídios, 50 a 56% de proteínas (JAMBO et al., 2016). É importante destacar que uma maior quantidade de carbono no meio de cultivo da microalga em relação aos demais nutrientes favorece o acúmulo de carboidratos na cepa (FERNANDES et al., 2016), portanto, podem ocorrer variações nestes valores. Assim, considerando os dados observados experimentalmente, foram elaborados e ajustados dois modelos matemáticos preditivos para descrever o comportamento da espécie em relação ao acúmulo de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas totais.

Com relação a realidade do NPDEAS, o trabalho desenvolvido em laboratório poderá ser implementado na escala industrial, aumentando o teor de carboidratos e lipídeos na cepa e possibilitando através de pesquisas futuras, a realização de uma rotina de produção de etanol, que pode ser utilizado na produção do biodiesel de terceira geração, permitindo que o biocombustível tenha rota de obtenção 100% sustentável, conforme a Figura 2. Portanto, o presente trabalho realizou a obtenção dos dados experimentais dos cultivos realizados em ambiente controlado com a microalga da espécie *Tetradesmus obliquus*, em condição foto autotrófica e mixotrófica, nesta última adicionando 5 g.L⁻¹ de glicerol. De acordo com os valores obtidos na concentração de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas, foram realizados dois modelos matemáticos simplificados a partir do metabolismo central, o primeiro considerando a hipótese logística e o segundo a formação do composto de inibição (I) a partir do glicerol. Os parâmetros dos modelos foram ajustados utilizando o software MATLAB® e o modelo da hipótese logística validado.

Figura 2 - POSSIBILIDADE DE APLICAÇÃO DA PRESENTE PESQUISA NAS ROTAS DE OBTENÇÃO DE BIODIESEL E BIOETANOL SUSTENTÁVEL.



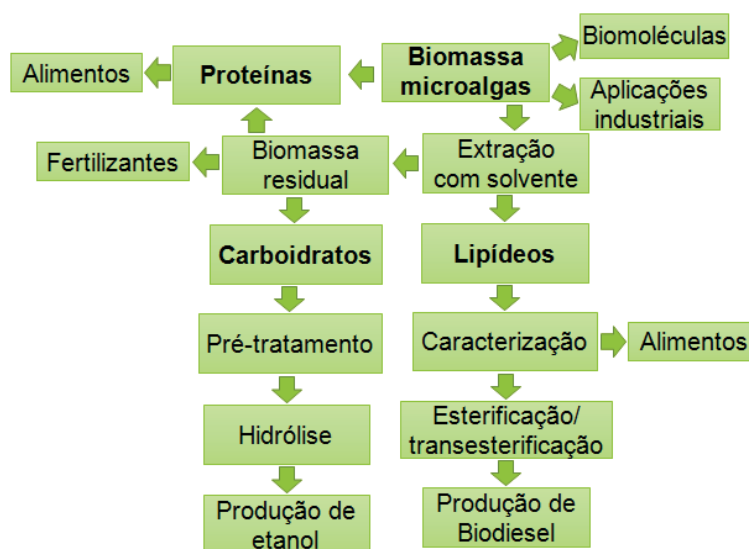
FONTE: A autora (2019).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MICROALGAS

Microalgas são organismos unicelulares e eucarióticos (LEHMUSKERO; CHAUTON; BOSTRÖM, 2018) capazes de realizar fotossíntese e converter dióxido de carbono (CO₂) em oxigênio (O₂) estimando-se que a proporção de conversão seja 2 kg de CO₂ para 1 kg de biomassa (SAJJADI et al., 2018). As aplicações biotecnológicas das microalgas possuem finalidades como a produção de suplementos alimentares, fármacos, cosméticos e bioenergia (SHOW et al., 2017). O cultivo destes seres é classificado em quatro fases que podem se dividir em adaptação, desenvolvimento, estacionária e declínio, sendo que em cada uma ocorre o acúmulo em diferentes proporções de metabólitos. Assim, é fundamental a compreensão dos componentes necessários para cada etapa, considerando que a partir destes é possível reduzir gastos operacionais na produção da biomassa, tornando a tecnologia mais acessível para destinação do substrato (LIAO et al., 2018). A Figura 3 apresenta a possível destinação da biomassa de microalgas no setor do desenvolvimento de produtos (CHNG; CHAN; LEE, 2016; SATYANARAYANA; MARIANO; VARGAS, 2011).

Figura 3 - POSSÍVEIS APLICAÇÕES DA BIOMASSA DE MICROALGAS EM DIVERSOS SETORES TECNOLÓGICOS.



FONTE: a autora (2019).

2.1.1 Sistemas e tipos de cultivo

Os desafios para o cultivo de microalgas em alta escala de produção englobam a utilização de água e nutrientes nos fotobiorreatores. Estima-se que para cada 5000 L de cultivo sejam produzidos 1 kg de biodiesel (LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017), ou seja, o processo necessita de melhorias para que a produção aconteça em escala comercial, tornando os estudos nesta área fundamentais, sendo uma alternativa o reaproveitamento da biomassa residual para produção de etanol de terceira geração (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018), buscando proporcionar um maior aproveitamento da biomassa.

Nesta perspectiva, os cultivos podem ser realizados em sistemas abertos e fechados. O primeiro emprega lagoas ou tanques, apresentando limitações devido a grande área superficial utilizada, em consequência da profundidade necessária para que a radiação solar alcance de maneira homogênea as microalgas. Outro desafio é a presença de bactérias e fungos que podem acarretar um ambiente competitivo e interferindo na produtividade da espécie. Entretanto, nos sistemas fechados considera-se os fotobiorreatores que são geralmente constituídos por tubulações transparentes para que a luminosidade no meio permita a realização da fotossíntese pelas microalgas (BIBI et al., 2017). Estes sistemas facilitam a realização de um cultivo unialgal, com maior controle das trocas gasosas e das contaminações externas (SUNDARRAJAN et al., 2019).

Os cultivos podem se classificar como foto autotróficos, heterotróficos e mixotróficos. No primeiro, as microalgas utilizam CO₂ atmosférico e radiação luminosa, havendo redução de custos e alta produção de fotoquímicos e pigmentos, sendo o crescimento e a produtividade de biomassa relativamente baixos. No cultivo heterotrófico, o carbono orgânico é empregado elevando o custo de produção e ocasionando uma diminuição na porcentagem de pigmentos e fotoquímicos de valor agregado. Ainda, é notável o aumento no crescimento, na produção de biomassa e metabólitos como carboidratos e lipídios, podendo ser reduzida a área superficial dos fotobiorreatores. Em meio mixotrófico, é utilizado como fonte de energia CO₂ e carbono orgânico, que apesar do maior custo e risco de contaminação pela fonte carbono externa mesmo quando esterilizada, há um maior crescimento,

apresentando elevada razão de biomassa, lipídios e carboidratos obtidos, sendo os pigmentos e fotoquímicos preservados (ZHAN; RONG; WANG, 2017).

2.1.2 Composição e nutrientes fundamentais para o desenvolvimento

As microalgas constituem-se por metabólitos primários e secundários, sendo que carboidratos, lipídios (que apresentam na composição basicamente carbono) e proteínas (constituídas em grande parte por nitrogênio, na média 16%) compõem aproximadamente 80% da massa seca total destes seres (MARKOU; MONLAU, 2019). Neste sentido, os nutrientes fundamentais para o desenvolvimento das microalgas podem ser definidos pela razão molar de Redfield, onde se estima que os componentes ideais estejam presentes no meio de cultivo na estequiometria 106C:16N:1P, podendo ocorrer variações. De acordo com as diferentes culturas, ocorre a variabilidade nas concentrações de carbono, fósforo e nitrogênio (LAURENS; CHEN-GLASSER; MCMILLAN, 2017), sendo estes essenciais no crescimento das microalgas (ENAMALA et al., 2018).

É importante destacar que na formação de pigmentos, DNA e RNA presentes em menor quantidade na célula, também são necessários micronutrientes como Mg, Co, Zn, Mn, dentre outros primordiais para o metabolismo destes compostos (MARKOU; MONLAU, 2019). A Tabela 1 demonstra a composição aproximada da biomassa em condições consideradas adequadas, o teor sob regime de stress e os respectivos elementos que caracterizam cada metabólito.

Tabela 1 – COMPOSIÇÃO GERAL DA BIOMASSA DE MICROALGAS E PRINCIPAIS ELEMENTOS QUE CONSTITUEM CADA METABÓLITO

| Metabólito | Composição (%) | Condição de stress (%) | Elementos principais |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Carboidratos | 10 - 25 | > 50 | C |
| Lipídeos | 10 - 20 | > 50 | C (P e N em baixas quantidades) |
| Proteínas | 30 - 50 | < 15 | C, N e S |
| DNA e RNA | 2 - 8 | - | C,N e P |
| Pigmentos e fotossintéticos | 0,5 - 1,5 | < 0,3 | C, N, P, Mg, Fe, Mn e Ca |
| | 5 - 15 | > 3 | |
| Enzimas | - | - | C, N, P, Mg, Co, Fe e Mn |

FONTE: Markou e Monlau (2019), adaptado.

Em consequência das microalgas serem organismos aquáticos, no cultivo, o CO₂ utilizado para realização da fotossíntese se encontra dissolvido, ocasionando variações no potencial hidrogeniônico do meio (MARKOU; MONLAU, 2019). Ainda, a formação de íons HCO₃⁻ e CO₂ no meio pode ser prejudicial ao desenvolvimento da célula pois algumas espécies são incapazes de absorver ambos (CAMIRO-VARGAS et al., 2005). Outro fator é a presença de nitrogênio no cultivo em forma de nitrato (o qual as microalgas possuem capacidade de absorção) e amônia em baixas concentrações (pH<9), pois, acima desta faixa é tóxica aos microrganismos (MARKOU; MONLAU, 2019), inibindo o crescimento e podendo causar a morte celular.

O desenvolvimento das microalgas nem sempre está relacionado ao aumento da biomassa, pois, existem casos que ocorre um menor crescimento celular e maior acúmulo da mesma (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016), em consequência do aumento da concentração dos metabólitos pelas cepas. Assim, alterações na composição química do meio de cultivo podem induzir a produção de determinados compostos. Destaca-se ainda que a utilização de nutrientes sintéticos como fosfato, nitrato e outros tornam o processo ambientalmente e economicamente inviável, pois, estes elementos são fundamentais para o desenvolvimento das plantas e assim, causam competição com as culturas agrícolas. Desta maneira, a reciclagem dos compostos é fundamental para tornar a tecnologia da produção de microalgas promissora e para isto, o emprego de substratos de baixo valor agregado faz desnecessário total ou parcialmente o uso dos fertilizantes químicos (MARKOU; MONLAU, 2019), sendo também interessante técnicas para acúmulo de metabólitos na espécie utilizada.

2.1.3 Lipídeos e carboidratos: componentes na célula das microalgas

Os lipídios dividem-se em neutros (triacilglicerol (TAGs), diacilglicerol (DAGs), monoacilglicerol (MAGs), pigmentos, ácidos graxos livres e hidrocarbonetos) e polares (fosfolipídios e glicolípideos), também conhecidos como de reserva e estruturais, respectivamente. Neste contexto, basicamente os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) constituem a estrutura da célula, enquanto os TAGs são lipídeos de armazenamento, facilmente convertidos em energia metabólica. Estes últimos encontram-se na grande maioria saturados e em menor quantidade na

forma insaturada (SAJJADI et al., 2018). É importante destacar que o perfil lipídico acumulado pela microalga depende de fatores como nutrientes disponíveis no meio, salinidade, radiação ultravioleta (UV), temperatura, pH e da fase que se encontra o cultivo (PALIWAL et al., 2017).

Em consequência do alto valor agregado na produção de biomassa, torna-se viável a produção dos lipídeos para destinações nobres, como a indústria de fármacos (KUMAR et al., 2019; SAYEDA; ALI; EL-BAZ, 2015), ao invés da utilização na produção de biocombustíveis como o biodiesel. Desta forma, o emprego da biomassa residual para produção de etanol através da fermentação dos carboidratos é uma alternativa. Nesta perspectiva, lipídios e carboidratos são produzidos no processo conhecido como fotossíntese escura. Os hidratos de carbono possuem função biológica definida, dividindo-se em estruturais e de reserva (de maneira similar aos lipídios), sendo importante destacar que os primeiros são na maioria constituídos pela celulose e a hemicelulose e o segundo pelo amido (SAJJADI et al., 2018).

A celulose é o polímero mais abundante no reino vegetal, formada por ligações β 1-4-D-glucopiranosose na conformação $4C_1$, apresentando cadeia linear (ZHOU; BROADBELT; VINU, 2016). Além disso, possui função biológica estrutural formando a matriz polimérica juntamente com a hemicelulose e a lignina, que constitui o suporte das plantas. Entretanto, em microrganismos como as microalgas, é importante destacar a ausência da macromolécula lignina, o que torna a estrutura da celulose mais acessível à hidrólise (RIZZA et al., 2017).

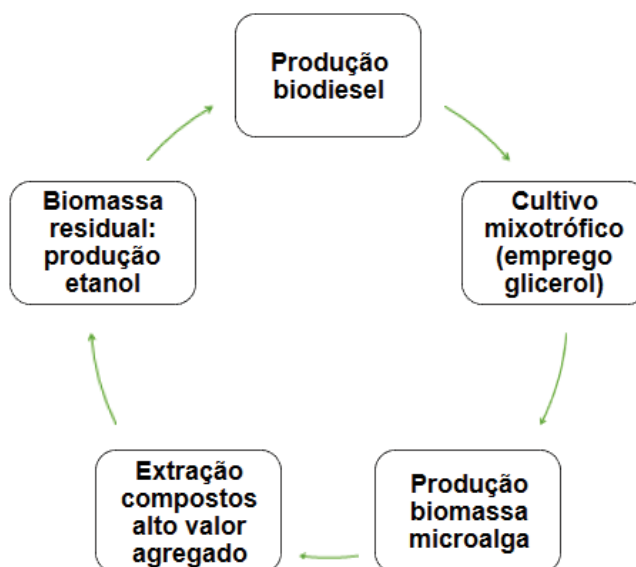
O amido é um carboidrato de reserva, presente nos vegetais, composto de amilose e amilopectina, sendo esta em maior concentração. A primeira constitui uma estrutura linear no formato de hélice, estando presentes na menor unidade da composição química monômeros de glucose unidos por ligação glicosídica no carbono α -1,4, sendo hidrossolúvel. Na amilopectina é possível observar dois tipos de ligação, na estrutura principal monômeros de glucose encontram-se ligados por ligações α -1,4 estando também presente ramificações com ligações α -1,6 (BERTOFT, 2017). De acordo com a classificação das espécies botânicas encontradas na natureza há diferenças na constituição estrutural do amido e neste contexto, a estrutura interna da amilopectina é responsável pelas características morfológicas da composição do grânulo de amido (ZHU, 2018), sendo importante destacar que no interior encontra-se a parte menos hidrofóbica que define a

característica amorfa e na externa uma estrutura cristalina no grão (BERTOFT, 2017).

2.2 MICROALGAS: BIOMASSA POTENCIAL COMO MATÉRIA PRIMA

Na produção de energias renováveis através da biomassa, as microalgas apresentam vantagens e dentre estas, podem ser destacadas a não competição com o setor alimentício que ocorre atualmente com relação a cana de açúcar e a soja utilizadas na produção de etanol e biodiesel, respectivamente. Outro fator é a menor extensão territorial necessária para o cultivo das microalgas e a alta taxa de crescimento/produtividade de metabólitos em comparação com culturas agrícolas, como também a capacidade de biorremediação de efluentes e conversão para biomassa (MATHIMANI et al., 2019). Como argumentado durante o documento, a incorporação dos processos torna viável o emprego de subprodutos industriais para o cultivo destes microrganismos e redução nos custos de produção, gerando uma alternativa mais sustentável. Em relação a biomassa, após a extração lipídica, uma possibilidade é a utilização do substrato residual para produção de etanol. A partir do exposto, é promissor o emprego do montante de glicerol no cultivo de microalgas para aumento dos carboidratos e lipídeos, assim como o tratamento do efluente. A Figura 4 demonstra o conceito de biorrefinaria e sustentabilidade deste processo.

Figura 4 - CONTEXTO DE SUSTENTABILIDADE E BIORREFINARIA



Fonte: A autora (2019).

2.1.4 Fatores que influenciam no desenvolvimento do cultivo e metodologias para enriquecimento nutricional

O cultivo das microalgas é influenciado por fatores abióticos como a temperatura, o pH, a radiação luminosa e a presença de íons. E também por fatores bióticos, por exemplo, a presença e interação de microrganismos como bactérias e fungos no meio. Com relação aos fatores abióticos, estes podem ser variados buscando as condições ideais para o cultivo das microalgas. No metabolismo foto autotrófico, para a realização da fotossíntese, a microalga utiliza como fonte de carbono o HCO_3^- , carbonato (CO_3^{2-}) e o CO_2 enquanto no heterotrófico, o carbono orgânico é consumido (IASIMONE et al., 2018). Ainda, a variação da intensidade da radiação luminosa pode interferir na absorção de diferentes fontes de carbono orgânico, como o ácido acético, glucose e glicerol (PATEL et al., 2019).

Dentre as técnicas utilizadas para o aumento de metabólitos em microalgas ressalta-se a engenharia genética, que busca o aprimoramento de organismos com capacidades específicas melhoradas. Entretanto, diversos são os questionamentos com relação à segurança ambiental, necessitando maiores estudos para obter informações sobre a interação destes organismos geneticamente modificados com o meio (DARDA; PAPALAS; ZABANIOTOU, 2019). Portanto, apesar de promissora, a técnica do melhoramento genético evidenciando as funções de interesse na célula ainda está restrita a cultivos em pequenas proporções.

Considerando a importância do equilíbrio celular na razão C : N para o crescimento da célula (MARKOU; MONLAU, 2019), em condições de fome de nitrogênio, ocorre a maior produção dos carboidratos e lipídios (MARKOU; MONLAU, 2019; RIZZA, et al., 2017; PATNAIK; MALLICK, 2015), pois, o nitrogênio é responsável pelo crescimento e divisão celular (SHUNNI et al., 2016) e quando a concentração não é ideal, estes dois fatores são inibidos. Os carboidratos são fontes de armazenamento energético das microalgas para síntese dos lipídios na ausência de nitrogênio (KONG et al., 2013) e assim, quando inibido este último, ocorre maior acúmulo de carboidratos. Outro mecanismo para enriquecimento nutricional de carboidratos na microalga é o controle de enxofre, eficiente para cultivos numa escala de menor tempo, onde as células demonstram redução na produção de proteínas e aumento dos carboidratos. Contudo, em períodos mais longos ocorre a

redução destes últimos (RIZZA et al., 2017), o que no conceito de biorrefinaria, utilizando a biomassa residual para produção de etanol, não é interessante.

A partir do exposto, os métodos para modificações no cultivo devem avaliar tempo de produção, custo de operação e adaptação da cepa de acordo com a metodologia realizada. Além disso, as alterações no meio de cultura necessitam considerar a posterior destinação da biomassa. Buscando a maior produtividade, é fundamental a aplicação de coprodutos industriais como substrato, sendo o glicerol uma alternativa para a produção de compostos nas microalgas, que podem ser convertidos em produtos. O emprego do tri-álcool altera a composição bioquímica das células, diminuindo a produção de proteínas e pigmentos e aumentando os teores de carboidratos e lipídios (KONG et al., 2013). Além disso, é possível realizar o tratamento biológico de efluentes através do consumo do glicerol pelos microrganismos (MORAIS et al., 2019). Desta maneira, na literatura constam inúmeros trabalhos utilizando diferentes espécies e mecanismos em cultivo mixotrófico com glicerol, sendo apresentados na Tabela 2.

Como fonte de energia, o glicerol sugere que a absorção está interligada a fotossíntese, permitindo um maior crescimento. Em outros casos, não ocorre diferença no crescimento mixotrófico, fato que sugere a ausência de um sistema de metabolismo da molécula na microalga, não interferindo a presença deste no meio. Outra abordagem é que o glicerol possa ser utilizado como armazenamento de outros materiais e não como fonte de energia, o que ocasiona pouca influência no crescimento. Em determinadas microalgas, pode ocorrer um aumento menor quando expostas ao glicerol em comparação ao cultivo foto autotrófico, justificado por consequência do tri-álcool atuar como um inibidor em determinados sistemas metabólicos (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016).

No estado da arte, Andrulaviciute e colaboradores (2013) cultivaram a microalga *Scenedesmus obliquus* em regime mixotrófico adicionando diferentes concentrações de glicerol técnico em meio BG11 modificado, iniciando o inóculo com 0,287 g.L⁻¹. Através dos dados experimentais o valor de 5 g.L⁻¹ demonstrou melhor eficácia para o crescimento da espécie, acumulando a concentração de 2,15 g.L⁻¹ em biomassa, com uma produtividade de 0,229 g.L⁻¹.dia⁻¹. Contudo, o maior acúmulo de TAG foi observado com a concentração de glicerol de 10 g.L⁻¹, atingindo 15,12 %, em contrapartida a 5 g.L⁻¹, que apresentou 13,46%. Similarmente, com a espécie *Scenedesmus obliquus*, Choi e Yu (2015) realizaram cultivos em meio

Jaworski (JM) com inóculo inicial de $0.367 \text{ g.L}^{-1} \pm 0.6 \text{ g.L}^{-1}$, adicionando $0,74 \text{ L.min}^{-1}$ de CO_2 e variando a concentração de glicerol. A maior produtividade da biomassa para a espécie também foi alcançada na concentração de 5 g.L^{-1} do tri-álcool, sendo $0,231 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nesta mesma condição foram obtidos os maiores teores de TAG, ácidos graxos insaturados e ácidos graxos saturados, correspondendo a 16,24%, 79,77% e 20,23%.

Em determinadas espécies como a *Chlorella* sp. marinha e a *Nannochloropsis salina* (CCMP 1776) observou-se a necessidade da presença do nitrogênio para assimilação do glicerol, pois, na redução de nitrogênio ocorreu somente a absorção mínima do composto. Além disso, estes microrganismos necessitam da presença de luz para absorver eficientemente o glicerol no metabolismo (PODDAR; SEN; MARTIN, 2018). Em outros casos, a espécie *Chlorella vulgaris* UTEX2714 demonstrou uma maior capacidade de utilizar os nutrientes das águas residuais, oriundas de uma estação de tratamento que foram adicionadas como substrato juntamente com o glicerol no cultivo. Este fenômeno é consequência da razão mais equilibrada entre carbono e nitrogênio e também da presença de bactérias que apresentam uma relação de sinergia com as microalgas (REN et al., 2017).

Tabela 2 – CULTIVOS DE MICROALGAS NA LITERATURA UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO GLICEROL

| Autores | Meio | Luminosidade | Tempo (dias) | Aeração | Temperatura (°C) | Volume do frasco/cultivo (L) | Carbano orgânico | Espécies | Análises |
|------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------|--|-------------------------|---|---|---|--|
| Andruleviciute et al. (2013) | Meio BG11 modificado | 8 h/dia | 20 à 30 | - | 22 ± 2 | Volume 3 | Glicerol | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlorella</i> sp. • <i>Haematococcus</i> sp. • <i>Nannochloris</i> sp. • <i>Scenedesmus</i> sp. | <ul style="list-style-type: none"> • Produtividade biomassa / • Taxa de crescimento específico • Lipídeos (TAG e ácidos graxos). |
| Kong et al. (2013) | Soil extract Medium (SEM) modificado | 12 h/dia | 4 | - | 30 ± 1 | Volume de trabalho 0,25 / volume de meio 0,1. | <ul style="list-style-type: none"> • Glicerol • Glucose | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlorella vulgaris</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Carboidratos solúveis • Lipídeos • Produtividade biomassa • Pigmentos fotossintéticos • Proteínas solúveis • Taxa de crescimento específico |
| Leite et al. (2014) | Bold's Basal Medium (BBM) | Duas condições: 12 h de luz e escuridão total | 17 | - | - | Placas de micro titulação 0,0035. | <ul style="list-style-type: none"> • Glicerol • Xilose | <ul style="list-style-type: none"> • Cepas indígenas (<i>Chlorella</i> sp.) | <ul style="list-style-type: none"> • Biomassa • Perfil lipídeos • Taxa máxima de crescimento |
| Choi e Yu (2015) | Meio Jaworski (JM) | Ciclos de luz de 8 e 16 h. | 20 | Ar (0,5 L.min ⁻¹) e CO ₂ (0,74 L.min ⁻¹); | 23 ± 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Volume de trabalho 0,2 / volume de meio inicialmente 0,1; • 15 em fotobiorreator de painel óptico. | Glicerol bruto | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Botryococcus braunii</i> • <i>Chlorella vulgaris</i> • <i>Scenedesmus</i> sp. | <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos graxos • Produtividade biomassa • Taxa de crescimento específico • TAG |
| Lin e Wu (2015) | Meio Waine modificado | Luz | - | Ar com 10% de CO ₂ (cultivo) | 30 | Volume de trabalho 1 / volume de meio 0,8. | <ul style="list-style-type: none"> • Glicerol • Xilose | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlorella</i> sp. Y8-1 | <ul style="list-style-type: none"> • Biomassa • Perfil lipídico |

| do e com mixotróficas) | | fome de nitrato) | | do e com mixotróficas) | | fome de nitrato) | | fome de nitrato) | |
|------------------------|---|--|----|------------------------------|--------|--------------------------------|----------------|--|---|
| Morais et al. (2019) | Líquido Zarrouk | 12h/dia | 15 | Aeração constante; | 30 | Volume 0,8 | Glicerol (85%) | <i>Spirulina</i> sp. O LEB 18 | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Nannochloropsis salina</i> (CCMP 1776) • Produtividade de lipídeos • Carboidratos • Lipídios • Perfil de ácidos graxos • pH • Pigmentos • Produtividade biomassa • Proteínas |
| Patel et al. (2019) | Tris-fosfato (TP) com meio líquido NH ₄ ⁺ | Iluminação constante ou ciclos de 18 h luz e 6 h escuridão | | 5% CO ₂ constante | 25 ± 2 | Volume frasco / volume do meio | 0,25 / 0,1 | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Chlorella</i> UTEX-256 • <i>Chlorella</i> UTEX-2805 • <i>Chlorella</i> UTEX-395 | <ul style="list-style-type: none"> • Biomassa seca • Densidade celular • pH • Ácido acético • Glicose • Glicerol |

Fonte: A autora (2019).

2.3 BIOCOMBUSTÍVEIS COMO ALTERNATIVA AOS COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS

Considerando o aumento do consumo energético mundial é fundamental analisar os gargalos de produção dos combustíveis. A crescente preocupação com as iniciativas de sustentabilidade e dependência das fontes fósseis destaca os biocombustíveis, que utilizam matérias primas renováveis e podem ser classificados em quatro gerações. A Tabela 3 demonstra os aspectos gerais de cada classe (DARDA; PAPALAS; ZABANIOTOU, 2019). É possível verificar que a característica renovável da matéria não a torna necessariamente sustentável e diante deste cenário, é importante o emprego do conceito de biorrefinaria, como discutido previamente. É abordado nas próximas seções o contexto da produção de etanol e biodiesel, a importância destes biocombustíveis para a inserção das políticas verdes e a contribuição na matriz energética Brasileira buscando a redução das emissões dos gases poluentes.

Tabela 3- CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS BIOCOMBUSTÍVEIS: VANTAGENS E DESVANTAGENS

| Biocombustíveis | Matéria prima | Vantagens | Desvantagens |
|------------------------|---|---------------------------------------|---|
| Primeira geração | Substratos que competem com o setor alimentício | Domínio dos processos e da tecnologia | <ul style="list-style-type: none">• A matéria prima utilizada evidencia a disputa alimento x combustível;• Vastas extensões territoriais;• Grandes quantidades de água na cultura;• Dependência das fontes fósseis para logística na obtenção de matéria prima até as etapas finais. |
| Segunda geração | Coprodutos de processos industriais e agroindustriais | Correta destinação dos resíduos | <ul style="list-style-type: none">• Com exceção da competição com alimentos, todos os aspectos mencionados nos biocombustíveis de primeira geração. |
| Terceira geração | Algas e microalgas | Alta de taxa de produção de biomassa | <ul style="list-style-type: none">• Alto consumo de energia e nitrogênio• Processos ainda não disponíveis em escala piloto e industrial |
| Quarta geração | Lixo e organismos geneticamente modificados | Economia circular | <ul style="list-style-type: none">• Custos e gastos energéticos elevados. |

Fonte: A autora (2019).

2.2.1 Etanol

O etanol é um composto polar com estrutura química C_2H_5OH (PANDIYAN et al., 2019), obtido a partir do processo de fermentação, na qual ocorre a conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono. No substrato, as hexoses presentes são fermentadas por leveduras, sendo esses microrganismos capazes de converter a glucose em etanol de acordo com a equação 1 (ZABED et al., 2017).



O etanol é um biocombustível com potencial para diminuir a utilização dos combustíveis fósseis, podendo ser empregado totalmente nos motores dos veículos automotivos. Entretanto, para que esta tecnologia seja utilizada em escalas consideráveis, é necessário que as indústrias automobilísticas contribuam no desenvolvimento para atender as especificidades proporcionando o funcionamento dos automóveis com etanol (JAMBO et al., 2016). Em relação ao cenário global, o ranking do mercado que lidera a produção deste biocombustível pertence ao Estados Unidos, que utiliza como matéria prima o milho, enquanto o Brasil ocupa a segunda posição, empregando como biomassa a cana de açúcar (ZABED et al., 2017).

Para melhor compreender a importância do etanol na matriz energética Brasileira, é interessante conhecer as políticas de incentivo à produção deste biocombustível que iniciaram no século XX, em decorrência do alto preço dos barris de petróleo no início da década de 1970. No ano de 1975 foi iniciado o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), onde o principal objetivo era suprir a demanda de combustível no país. Por volta do ano de 1979, as indústrias automobilísticas adaptaram-se as tecnologias existentes, construindo veículos que empregaram álcool hidratado (95%), fato este que permitiu a independência parcial com relação as fontes fósseis de combustíveis (CORTEZ et al., 2016). Nesta perspectiva, de acordo com a resolução 01/77, estabelecida pelo Instituto do Álcool e do açúcar (IAA), o etanol foi classificado como álcool anidro, adicionado à gasolina como aditivo, álcool industrial e álcool hidratado 5%, empregado nos motores flex (BRASIL, 1983).

Incluído na classificação dos biocombustíveis apresentada, atualmente o etanol pode ser de primeira, segunda ou terceira geração (ZABED et al., 2017). Na primeira geração, a matéria prima para a cadeia produtiva é oriunda da cana de açúcar (RIZZA et al., 2017). Além da necessidade de açúcares pouco complexos para facilitar a fermentação dos microrganismos, a produção de etanol açucareiro é algo questionável, considerando que grande parte dos carboidratos ficam retidos no substrato (DALENA et al., 2019). Outro fator é a extensa área territorial utilizada para cultivo das plantações canavieiras e a poluição gerada no processo (RIZZA et al., 2017) como a realização das queimadas e transporte. Apesar da disponibilidade territorial Brasileira propensa para o cultivo da cana de açúcar, é primordial considerar fatores como a competição entre comida e alimentos (ABUD; SILVA, 2019; HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019), que foram mencionados como um dos grandes desafios na produção de biocombustíveis de primeira geração, assim como o envelhecimento dos canaviais (MME, 2018), que comprometem a disponibilidade da matéria prima para suprir a demanda nacional.

Na produção do etanol de segunda geração, o substrato para fermentação é constituído de coprodutos lignocelulósicos. Entretanto, a presença da macromolécula lignina envolvendo a celulose dificulta a obtenção de uma maior eficiência no processo fermentativo, sendo necessários pré tratamentos para transformar estruturas complexas em açúcares simples e esta etapa adicional, aumenta os custos envolvidos no processo (ZABED et al., 2017). Portanto, apesar da interessante destinação dos coprodutos lignocelulósicos para contribuir na geração da matriz energética brasileira, maiores estudos são fundamentais para que esta tecnologia seja utilizada em grandes proporções no cenário dos biocombustíveis.

As vantagens do etanol de terceira geração em relação ao de primeira e segunda são as microalgas cultivadas em fotobiorreatores que ocupam áreas relativamente pequenas quando comparada a produção de cana de açúcar (BIBI et al., 2017). As microalgas são ainda utilizadas na biorremediação, no tratamento de efluentes e para absorver e fixar da atmosfera compostos como o CO₂, reduzindo as concentrações deste poluente, que é um dos causadores do aquecimento global (SHOW et al., 2017). Como apresentado neste documento, diferentemente do substrato de segunda geração, as microalgas não apresentam a macromolécula

lignina na estrutura celular, permitindo uma maior acessibilidade na obtenção dos monômeros utilizados na fermentação.

A partir do exposto, fica evidenciada a importância de pesquisas na área, com o objetivo de utilizar como matéria prima compostos de origem sustentável e renovável, sendo as microalgas uma estratégia interessante e em desenvolvimento, pois, atualmente a produção de etanol de terceira geração se encontra limitada à escala laboratorial (ZABED et al., 2017). Desta maneira, visando o desenvolvimento de combustíveis renováveis com menores emissões de gases poluentes, tempo na produção da matéria prima e baixo custo de comercialização, em países que apresentam reduzido território, o etanol de terceira geração é uma opção considerável.

2.2.2 Biodiesel

A produção mundial de biodiesel atingiu 36,6 bilhões de litros em 2017, sendo que o ranking pertence aos EUA e ao Brasil, com 16% e 11%, respectivamente (REN21, 2019). A matéria prima utilizada para produção de biodiesel nos EUA é o óleo oriundo do milho, considerado um coproduto da extração do amido (VELJKOVIĆ et al., 2018). No Brasil, o óleo de soja é utilizado como substrato sendo um subproduto da extração de proteínas da oleaginosa (OLIVEIRA; COELHO, 2017). O biodiesel é produzido através da transesterificação que consiste na reação de um TAG com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), na razão de 1:3 mols, na presença de um catalisador (THOAI et al., 2017), sendo comumente utilizado o hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) (ARAÚJO et al., 2013) pelo baixo custo e alta eficiência na conversão dos ésteres. Neste contexto, a reação de transesterificação possui etapas reversíveis, ocorrendo nas duas primeiras uma substituição nucleofílica, sendo liberado como produto final 3 mols de éster e um do tri-álcool glicerol (SINGH; KUMAR; BLÜMICH, 2019). As reações intermediárias são apresentadas nas equações 2, 3 e 4, respectivamente.



A história do biodiesel no cenário brasileiro iniciou em meados da década de 1920, onde foram realizados os primeiros experimentos com este biocombustível (SOLOMON; BAILIS, 2014). Contudo, somente na década de 1970 com a crise do petróleo foi criado o Programa Nacional do Biodiesel (PRO-ÓLEO) de acordo com a resolução nº 007 de 22 de outubro de 1980. Diversas foram as tentativas de instituir na matriz energética Brasileira, em 2002 foi aprovado o decreto nº 702 em 30 de outubro, incentivando os produtores com a implementação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico para o Biodiesel (PROBIODIESEL). Entretanto, somente em 2005, com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), este biocombustível foi implementado significativamente, iniciando o acréscimo de 2% do biodiesel ao diesel comum, que passou a ser obrigatório no ano de 2008 (OLIVEIRA; COELHO, 2017).

Atualmente, de acordo com a Lei nº 13.263, instituída em 23 março de 2016, fica aprovado que os percentuais de adição do biodiesel ao diesel comum são de 8, 9 e 10%, no período de doze, vinte e quatro e trinta e seis meses após o sancionamento (BRASIL, 2016), com perspectivas de aumento futuro a partir de 2019 até março de 2023 para 15%, através da resolução nº 16 de 29 de outubro de 2018 (BRASIL, 2018). A crescente produção sugere o emprego das fontes alternativas de matéria prima e uma destinação correta do coproduto gerado, pois, o glicerol quando descartado de maneira inadequada pode causar danos ambientais irreversíveis, contrariando a política verde da instituição do biodiesel em veículos automotores. Uma possibilidade para destinação deste subproduto é o cultivo de microrganismos, como as microalgas, pois, atualmente, com o aumento do consumo energético global e o crescimento populacional surge a necessidade de novas fontes para a substituição parcial ou total daquelas utilizadas no biodiesel.

2.4 MODELAGEM MATEMÁTICA

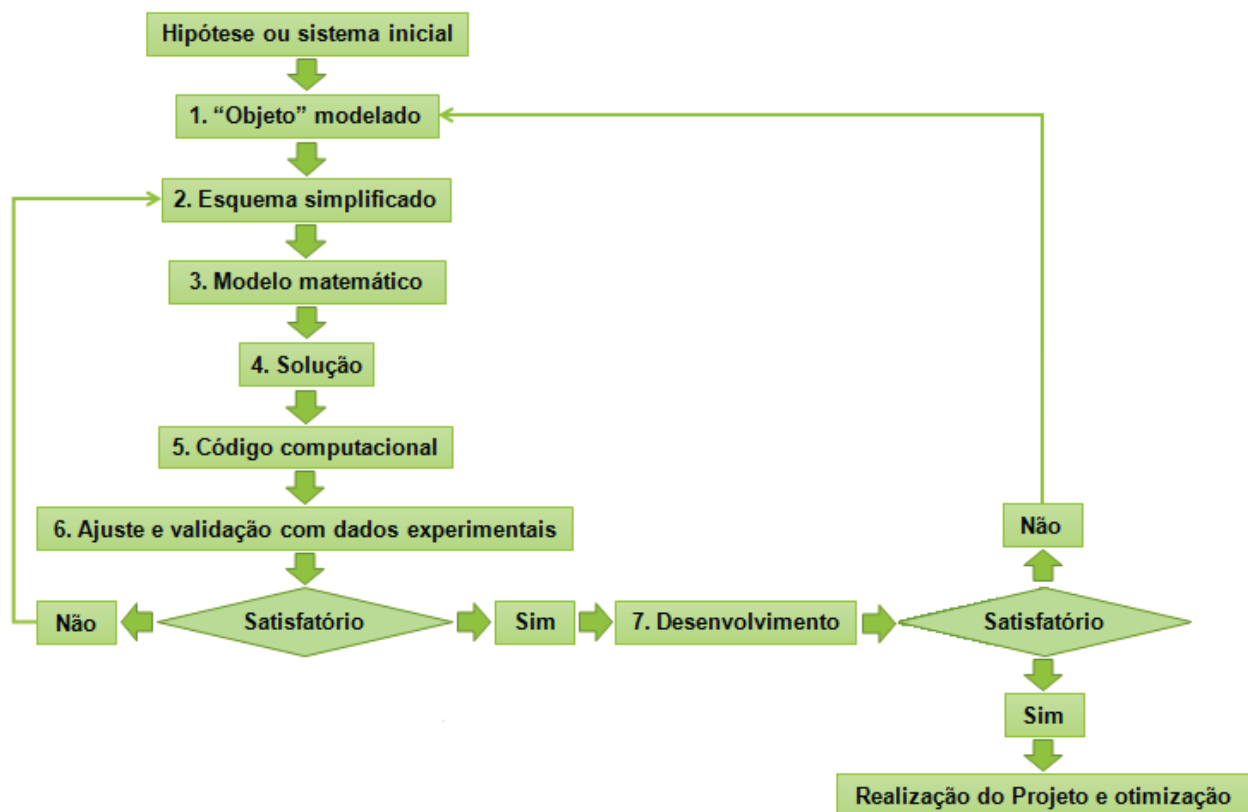
A necessidade de representar o mecanismo intracelular de microalgas e cianobactérias consideram algumas generalidades para ambas as espécies (BAROUKH et al., 2015a). Para prever o desenvolvimento dos microrganismos foram elaborados modelos simplificados como o modelo exponencial, utilizado na descrição do comportamento inicial da cultura, entretanto, em longo prazo, a previsão é inadequada e considerando a importância para decisões futuras, é

ineficiente para determinados contextos, não sendo capaz de prever as influências dos fatores externos na cultura como os nutrientes disponíveis no meio, as variações ambientais e o envelhecimento das células.

Após, o modelo logístico proposto por Verhulst inclui a constante de saturação, apresentando um comportamento mais coerente a realidade observada, sendo um aprimoramento do modelo exponencial (TSOULARIS; WALLACE, 2002). A definição do modelo logístico descreve que “*a resistência ou a soma dos obstáculos opostos ao desenvolvimento indefinido da população aumenta proporcionalmente ao quadrado da taxa em que a população tende a aumentar*” (VOGELS et al., 1975, p. 184), ou seja, considera que o crescimento da população em um dado intervalo de tempo é diretamente proporcional a intensificação dos fatores que ocasionam as limitações físicas nos indivíduos (condições estas não consideradas no modelo exponencial), acarretando a tendência em atingir a fase estacionária.

Posteriormente, o modelo de Monod foi elaborado para descrever o desenvolvimento das populações, considerando as alterações ocasionadas no meio devido à presença dos microrganismos. A equação geral de Monod é uma extensão da equação de Michaelis, destacando que o modelo inclui a limitação dos nutrientes causada pelo consumo dos organismos, a formação dos produtos inibitórios e a modificação do pH no cultivo (MONOD, 1949). Portanto, os modelos matemáticos são desenvolvidos com a finalidade de prever comportamentos e otimizar as etapas envolvidas na produção dos componentes de interesse. A Figura 5 apresenta o diagrama que descreve as hipóteses direcionando a elaboração da modelagem de um sistema (VARGAS; ARAKI, 2017).

Figura 5 – ESQUEMA PARA FORMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO DE UM SISTEMA



FONTE: Vargas e Araki (2017), adaptado.

De acordo com o fluxograma apresentado, as hipóteses elaboradas precisam ser coerentes com a realidade e fundamentadas em argumentos específicos. Nesta perspectiva, através do modelo biológico de microrganismos é possível observar trabalhos envolvendo o metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas, DNA e RNA que apesar de simplificados, relatam de maneira eficiente o comportamento dos organismos e assim, a engenharia metabólica é uma ferramenta promissora (BAROUKH et al., 2015a). O estado da arte utiliza inúmeras espécies em cultivos mixotróficos e foto autotróficos explicando o crescimento, a formação de metabólitos e o acúmulo de biomassa. A Tabela 4 apresenta pesquisas que realizaram a modelagem matemática de sistemas biológicos das microalgas.

Tabela 4 - ESTADO DA ARTE: MODELAGEM MATEMÁTICA DE ACÚMULO DE BIOMASSA E METABÓLITOS

| Autores | Microalga | Cultivo | Fatores analisados | Validação |
|--|--|--------------------------------|---|-------------------|
| Mairet et al. (2011) | <i>Isachrysis affinis galbana</i> | Foto autotrófico | Crescimento, acúmulo de lipídios neutros e carboidratos e fluxo de carbono para formar membranas, ácidos nucleicos e proteínas. | Experimento |
| Yang et al (2011) | <i>Chlorella minutissima</i> UTEX 2341 | Mixotrófico | Crescimento, lipídeos e consumo de glicerol. | Experimento |
| Guest et al. (2013) | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Foto autotrófico | Lipídeos, carboidratos, biomassa, nitrato e fosfato, dentre outros nutrientes. | Experimento |
| Klok et al. (2013) | <i>Neochloris oleoabundans</i> | Foto autotrófico | Amido, biomassa e TAG. | Experimento |
| Adesanya et al. (2014) | <i>Chlorella vulgaris</i> | Mixotrófico e foto autotrófico | Amido, biomassa e TAG. | Experimento |
| Baroukh et al. (2015b) | <i>Tisochrysis lutea</i> | Foto autotrófico | Acúmulo de carboidratos e lipídeos (dia e noite) | Experimento |
| Yoo, Kim e Lee (2014) | <i>C. protothecoides</i> | Mixotrófico | Radiação luminosa, nitrogênio e carbono na entrada. Glicina, glucose, lipídios e biomassa na saída do sistema | Experimento |
| He et al. (2016) | <i>Isochrysis galbana</i> | Foto autotrófico | Lipídeos e biomassa | Experimento |
| Figueroa-torres, Pittman e Theodoropoulos (2017) | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . | Mixotrófico | Crescimento, lipídeo e amido | Experimento |
| Ryu et. al (2018) | <i>Nannochloropsis oceanica</i> | Foto autotrófico | Crescimento, carboidratos, lipídios e proteínas | Jia et al. (2015) |

FONTE: A autora (2019).

A partir do exposto, Mairet et al. (2011) desenvolveram um modelo matemático do crescimento e acúmulo de carbono no interior da célula (constituindo as proteínas, as membranas e os ácidos nucleicos) e mais dois compartimentos que se dividem em lipídios neutros e carboidratos, com o objetivo de avaliar e definir a melhor condição para a incidência da luz e concentração de nitrogênio, sendo capaz de prever a produção de biomassa, carboidratos e a produtividade de lipídios neutros. Para validação do modelo foram coletados dados experimentais da espécie *Isachrysis affinis galbana*. Figueroa-torres, Pittman e Theodoropoulos (2017) realizaram a modelagem matemática do crescimento, produção de lipídios e amido

em microalgas. Os dados experimentais para validação foram obtidos através do cultivo mixotrófico com a espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizando acetato e inibindo nitrogênio. O modelo preditivo foi capaz de calcular a concentração inicial adequada de nitrogênio e carbono empregadas no meio de cultura.

Ainda, Guest et al. (2013) consideraram para a elaboração do modelo matemático a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* e para validação utilizaram os dados do cultivo em regime foto autotrófico em fotobiorreator, empregando um mix de microalgas oriundas das águas residuais da rede de tratamento de esgoto sanitário. A modelagem avaliou o armazenamento de lipídeos, carboidratos e biomassa funcional, dentre outros nutrientes como fosfato e nitrato. Yoo, Kim, Lee (2014) cultivaram a microalga *C. protothecoides* em fotobiorreatores utilizando meio mixotrófico e como fonte de nitrogênio e carbono adicionaram glicina e glucose, respectivamente. Os dados experimentais foram empregados para validação do modelo matemático que permite verificar a radiação luminosa e as concentrações de carbono e nitrogênio na entrada, assim como a concentração de lipídios, biomassa, glicina e glucose na saída do sistema.

Outros autores como He et al. (2016) formularam um modelo matemático para avaliar a relação da produção de proteínas, lipídios e também o acúmulo de biomassa de acordo com os nutrientes disponíveis no meio. Os dados para validação experimental utilizaram a espécie *Isochrysis galbana* cultivada em fotobiorreator de placa plana variando as concentrações de nitrato de sódio (NaNO_3) no meio. Yang et al. (2011) descreveram a formação de lipídios, o consumo de glicerol e o crescimento através do modelo matemático elaborado. Para validação a partir dos dados experimentais, foi realizado o cultivo mixotrófico com a espécie *Chlorella minutissima* UTEX 2341, alterando as concentrações de caseína e glicerina empregadas como fonte de nitrogênio e carbono.

O modelo desenvolvido por Klok et al. (2013) apresenta a produção de amido, biomassa e o acúmulo de lipídeos (TAG), de acordo com a luminosidade e o nitrogênio disponível. A espécie *Neochloris oleo abundans* foi cultivada para obtenção dos dados e posterior validação experimental. Ryu et al. (2018) realizaram um modelo matemático explicando o acúmulo de carboidratos, lipídeos e proteínas a partir do metabolismo central e para validação, foram utilizados os dados experimentais do trabalho realizado por Jia et al. (2015) com a espécie *Nannochloropsis oceanica*. Baroukh et al. (2015b) desenvolveram um modelo

matemático para explicar o acúmulo de carboidratos e lipídeos no período diurno e noturno, utilizando na validação a microalga *Tisochrysis lutea* em condição foto autotrófica. É possível destacar que o estado da arte apresenta modelos interessantes para a explicação da formação dos metabólitos celulares, entretanto, até o presente momento não foi encontrado um modelo matemático que descreva o acúmulo de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas em meio mixotrófico utilizando como fonte de carbono glicerina.

3 JUSTIFICATIVA

O contexto apresentado na fundamentação teórica destaca as microalgas como uma matéria prima promissora para a geração mais sustentável de energia, considerando a capacidade de biorremediação destes microrganismos, captura e conversão dos gases de emissão em metabólitos de alto valor agregado, assim como a utilização de subprodutos industriais como fonte de carbono orgânico no cultivo, destacando o glicerol, pois, devido à crescente adição de biodiesel nos veículos automotores, ocorre a grande disponibilidade do tri-álcool. Portanto, a partir das inúmeras pesquisas no estado da arte que utilizaram diferentes espécies de microalgas para cultivo mixotrófico com este composto, surge a importância de modelos matemáticos capazes de prever o comportamento do acúmulo de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas na presença do glicerol. Neste cenário, é apresentado na fundamentação teórica trabalhos sobre os modelos de crescimento e acúmulo das macromoléculas em microalgas, sendo nesta dissertação, elaborados dois modelos matemáticos que buscam prever a formação da biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas totais a partir do tri álcool. Desta forma, considerando que um dos grandes gargalos para a produção de microalgas é o alto custo, a partir do modelo logístico foi possível calcular a tendência da produtividade e a concentração dos componentes mencionados em diferentes períodos para a microalga *Tetradismus obliquus* nas condições utilizadas nesta pesquisa, contribuindo para o desenvolvimento na área e permitindo uma destinação mais adequada da biomassa de acordo com as diferentes aplicações.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a realização da modelagem matemática e validação experimental do cultivo da microalga da espécie *Tetradismus obliquus* em meio foto autotrófico e mixotrófico com glicerol.

4.1.1 Objetivos específicos

- Obtenção dos dados experimentais para análise do comportamento no acúmulo de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas totais, no cultivo da microalga *Tetradismus obliquus* na condição foto autotrófica e mixotrófica;
- Desenvolvimento de dois modelos matemáticos a partir dos dados experimentais: um utilizando a hipótese logística e o outro a hipótese da inibição pelo glicerol;
- Ajuste dos parâmetros envolvidos nos modelos matemáticos e validação experimental do modelo matemático da hipótese logística.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

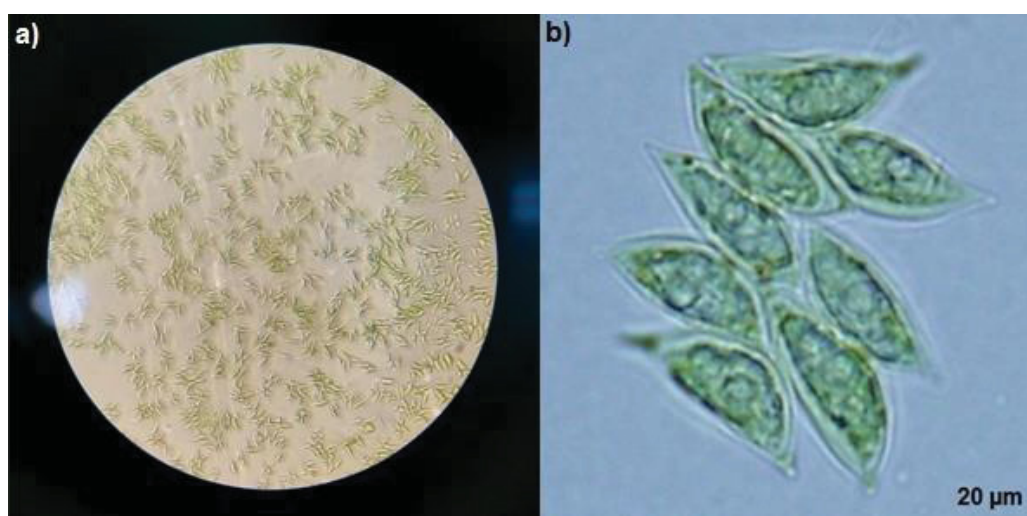
O tópico que apresenta a descrição dos materiais e métodos foi dividido em três seções. A primeira identificada como 5.1, relata as etapas na obtenção dos dados experimentais. Na sequência, a seção 5.2 descreve as hipóteses e as equações consideradas para elaboração dos modelos matemáticos. Por fim, a seção 5.3 expõe a metodologia empregada para o ajuste dos parâmetros, assim como a validação do modelo matemático da hipótese logística.

5.1 OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

5.1.1 Origem da microalga *Tetradismus obliquus* e condições de cultivo do inóculo inicial

A microalga *Tetradismus obliquus* foi isolada no laboratório do NPDEAS, localizado na UFPR. A espécie é originalmente encontrada na água da rede de abastecimento local, da cidade de Curitiba, estado do Paraná, Brasil. A Figura 6 apresenta a imagem da célula obtida em a) microscópio óptico em câmara de Neubauer com aumento de 400x e b) microscópio Olympus BX40 com câmara de captura acoplada Olympus DP71 através da objetiva de 100x.

Figura 6 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA MICROALGA DA ESPÉCIE *Tetradismus obliquus*



FONTE: A autora (2019).

O inóculo foi cultivado em meio CHU, seguindo como protocolo a norma NBR 12648 (2011). O volume da solução 1 à 6 adicionado no cultivo foi de 10 mL e da solução 7 à 10 foi de 1 mL em cada litro, respectivamente. Os reagentes e a concentração utilizada em cada solução são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO CHU UTILIZADO PARA CULTIVO DA MICROALGA *Tetradismus obliquus* EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.

| Solução | Composição | Concentração (g.L ⁻¹) |
|---------|--|-----------------------------------|
| 1 | NaNO ₃ | 25 |
| 2 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,5 |
| 3 | MgSO ₄ .7H ₂ O | 7,5 |
| 4 | K ₂ HPO ₄ | 7,5 |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | 17,5 |
| 6 | NaCl | 2,5 |
| 7 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O | 50 |
| | KOH | 31 |
| 8 | FeSO ₄ .7H ₂ O | 4,98 |
| 9 | H ₃ BO ₃ | 11,42 |
| 10 | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,0882 |
| | MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,0144 |
| | NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,00119 |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,0157 |
| | Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 0,0049 |

FONTE: A autora (2019).

Em seguida, o material foi auto clavado, de acordo com o manual de JACINAVICIUS, na temperatura de 125 °C, a 1,5 atm por um período de 30 minutos. Após, o inóculo foi manuseado em fluxo laminar previamente esterilizado por 20 minutos. A manutenção do inóculo teve duração de 3 semanas com repique a cada 7 dias, no volume de 1,6 L, em que o objetivo foi padronizar as células tornando-as mais homogêneas e garantindo a maior confiabilidade nos resultados experimentais obtidos.

5.1.2 Avaliação da contaminação no meio cultivo

Para avaliar a possível presença de contaminantes biológicos no meio de cultivo contendo glicerol, além do microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer com aumento de 400x, foram realizados plaqueamentos em meio CHU sólido contendo 1,5 % de ágar. A Placa de Petri foi auto clavada seguindo o protocolo JACINAVICIUS descrito no item 5.1.1. A diluição seriada dos cultivos foi realizada

em fluxo laminar previamente esterilizado adicionando inicialmente o volume de 100 μL , com uma razão final do cultivo : solução salina 0,85 % de 1:1000.

5.1.3 Condições de cultivo e obtenção da biomassa nas diferentes fases do crescimento

Os ensaios contendo o inóculo foram cultivados em duplicatas no laboratório em frascos Erlenmeyers com volume de 1,6 L, a temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$, com luminosidade de 720-760 lux e fluxo de ar $1,5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, por um período de luz e aeração de 24 h ao dia. A Figura 7 apresenta imagens da bancada na sala de cultivo, em que foram acondicionados os Erlenmeyers. Acoplados a estes se encontram as mangueiras que fornecem ar originário de um motor de compressão localizado no ambiente externo do prédio.

Figura 7 – PRIMEIRO DIA DE CULTIVO DO INÓCULO

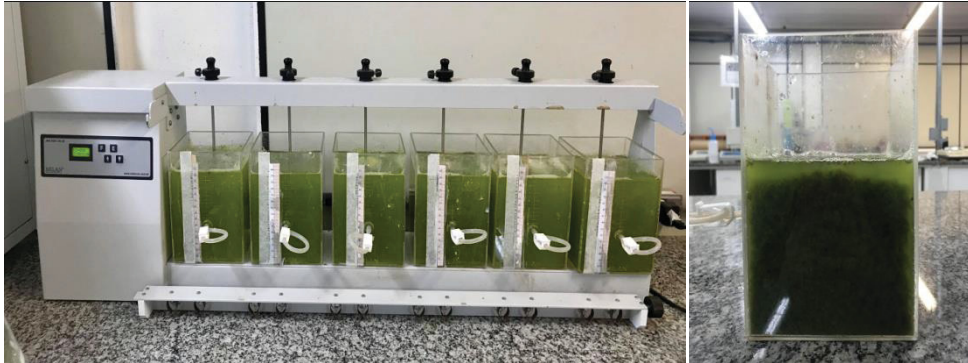


FONTE: A autora (2019).

O período de duração do experimento foi de 15 dias, com sacrifício do cultivo para coleta a cada três dias e realização das análises como o pH, a contagem celular, a densidade óptica e a biomassa seca. Para obtenção da biomassa, o cultivo foi submetido a um pH entre 6-7 utilizando ácido clorídrico (HCl). Na sequência, este foi acondicionado em compartimentos com capacidade de 2 L no Jar Test para floculação conforme apresentado na Figura 8 e então adicionou-se o floculante a base de tanino TANFLOC, na concentração de $0,2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nos 10 segundos iniciais foi

mantida a rotação máxima e depois reduzida para a metade, até completar o tempo de 10 minutos.

Figura 8 – EQUIPAMENTO JAR TEST UTILIZADO NA FLOCULAÇÃO E CULTIVO FLOCULADO



FONTE: A autora (2019).

Após aguardar a biomassa floculada decantar, realizou-se a filtração em um aparato constituído de um balão Kitasato acoplado em uma bomba a vácuo, retendo o recuperado em tecido. O esquema realizado e a biomassa coletada estão de acordo com a Figura 9.

Figura 9 – PROCEDIMENTO PARA RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA



FONTE: A autora (2019).

A secagem da biomassa recuperada ocorreu na estufa a uma temperatura de 60 °C, sendo ao fim macerada em um gral de porcelana com pistilo, até obtenção de grânulos, como é apresentado na Figura 10.

Figura 10 – BIOMASSA OBTIDA NO CULTIVO DA MICROALGA *Tetradismus obliquus* EM LABORATÓRIO



FONTE: A autora (2019).

A biomassa seca foi armazenada em congelador a uma temperatura aproximada de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar a oxidação e posteriormente foram realizadas as análises de carboidratos totais, lipídios totais e proteínas totais.

5.1.3 Descrição das análises do meio de cultivo

Para acompanhamento do desenvolvimento dos cultivos realizou-se as análises de pH, densidade óptica, contagem celular e quantificação de biomassa seca.

5.1.3.1 pH, absorvância, contagem celular e biomassa seca

O pH das amostras foi mensurado utilizando pHmetro mPA 210 para o controle do crescimento. Na análise da absorvância do cultivo, foi utilizado uma amostra com volume de 10 mL no espectrofotômetro UV/VIS PerkinElmer Lambda 25, com comprimento de onda de 540 nm. O crescimento celular e a quantificação de biomassa seca das microalgas foram realizados de acordo com Danesh et al. (2017). A contagem celular utilizou a câmara de Neubauer, no microscópio BIOVAL®, com lente de aumento de 400x. A biomassa seca foi quantificada por método gravimétrico, em que inicialmente mensurou-se a massa da membrana de fibra de vidro com $0,7\text{ }\mu\text{m}$ de retenção de particulado, utilizando balança analítica com precisão de quatro casas decimais, marca SHIMADZU e modelo AUW220D.

Em seguida, o volume de 10 mL foi retirado de cada Erlenmeyer e filtrado, sendo posteriormente colocado na estufa a uma temperatura de 70 °C até manter o peso constante. A Figura 11 demonstra a membrana após a recuperação da biomassa sendo resfriada para a pesagem.

Figura 11 – ESQUEMA UTILIZANDO DESSECADOR COM SILICA E BALANÇA ANALÍTICA PARA OBTENÇÃO DA BIOMASSA SECA



FONTE: A autora (2019).

Para cálculo do valor da biomassa seca (B_s), foi utilizada a equação 4.

$$B_s = \frac{(m_2 - m_1)}{V_f} \quad (4)$$

Em que m_1 é o peso seco da membrana, m_2 é o peso seco da membrana com a biomassa e V_f é o volume de cultivo utilizado para a análise.

5.1.4 Análises da composição das microalgas

5.1.4.1 Carboidratos totais

A análise de carboidratos totais utilizou a metodologia de Dubois et al. (1956), que consiste em um método colorimétrico. Para a realização deste, foram utilizadas as seguintes soluções: uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 80% (v/v), uma solução fenol 5% (m/v) e uma solução padrão de 0,1 g.L⁻¹ de glucose anidra. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm, em cubeta de quartzo com volume de 3 mL e 1 mm de espessura.

No preparo das amostras, 20 mg de biomassa foram pesadas e colocadas em tubos de penicilina e após, foi inserido 1 mL da solução de H₂SO₄ 80% previamente preparada. Nas quatro horas iniciais, as amostras foram mantidas em banho de gelo para evitar a carbonização. Em seguida, foram acondicionadas na bancada pelas próximas 16 h, totalizando 20 h. Na sequência, foram diluídas com 9 mL de água destilada e uma alíquota de 1,5 mL retirada do sobrenadante sendo transferida para diferentes Eppendorfs (MYKLESTAD; HAUG, 1972). Os recipientes foram centrifugados a 4000 rpm por um período de 20 min. Foi inserido em tudo de ensaio o volume de 0,5 mL da amostra tratada, 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e 0,5 mL da solução de fenol. Aguardou-se aproximadamente 30 min para realização da leitura.

5.1.4.2 Lipídios totais

A obtenção dos valores de lipídeos totais utilizou o método de Folch et al. (1957), adaptado por Hosseini et al. (2015). Inicialmente foi mensurado 0,05 g de biomassa e então inserido o volume de 1,2 mL da solução de clorofórmio : metanol, na razão 2 : 1. Em seguida os tubos de ensaio contendo a mistura foram colocados no ultrassom SCHUSTER L200, por um período de 30 minutos. Então, estes foram acoplados na centrífuga Daiki 80-2B-DM por 15 minutos, a 4000 rpm. O procedimento foi repetido por 3 vezes e em cada intervalo foi retirado o sobrenadante e depositado em tubos de penicilina previamente pesados. Após, os frascos permaneceram na estufa a 60 °C, até manter peso constante e o teor de lipídios totais foi calculado por método gravimétrico.

5.1.4.3 Proteínas totais

O procedimento de proteínas totais foi realizado pelo laboratório do Departamento de Nutrição Animal localizado na UFPR. A técnica utilizada foi a metodologia de Kjeldahl, que consiste na detecção de proteínas de maneira indireta através do teor de nitrogênio nas amostras, sendo o fator de conversão deste para microalgas 4,78 (TEMPLETON; LAURENS, 2015). Para extração do nitrogênio, foi realizado um tratamento da biomassa com ácido clorídrico e posterior quantificação.

5.1.4 Cálculo da produtividade de biomassa e metabólitos

Para cálculo da produtividade de biomassa (P_b) de acordo com o dia do cultivo foi utilizada a equação 4.

$$P_b = \frac{(b_f - b_i)}{\Delta t} \quad (4)$$

Em que, b_i é a concentração de biomassa inicial, b_f é a concentração de biomassa final e Δt é a variação do tempo.

Para cálculo da produtividade de carboidratos totais (P_{carb}) foi utilizada a equação 5.

$$P_{carb} = \frac{(b_f X_{cf} - b_i X_{ci})}{100 \Delta t} \quad (5)$$

Em que, X_{ci} é o teor de carboidratos no dia zero e X_{cf} é o teor de carboidratos final.

Para cálculo da produtividade de lipídios totais (P_{lip}) foi utilizada a equação 6.

$$P_{lip} = \frac{(b_f X_{lf} - b_i X_{li})}{100 \Delta t} \quad (6)$$

Em que, X_{li} é o teor de lipídeos no dia zero e X_{lf} é o teor de lipídeos final.

Para cálculo da produtividade de proteínas totais (P_{prot}) foi utilizada a equação 7.

$$P_{prot} = \frac{(b_f X_{pf} - b_i X_{pi})}{100 \Delta t} \quad (7)$$

Em que, X_{pi} é o teor de proteínas no dia zero e X_{pf} é o teor de proteínas final.

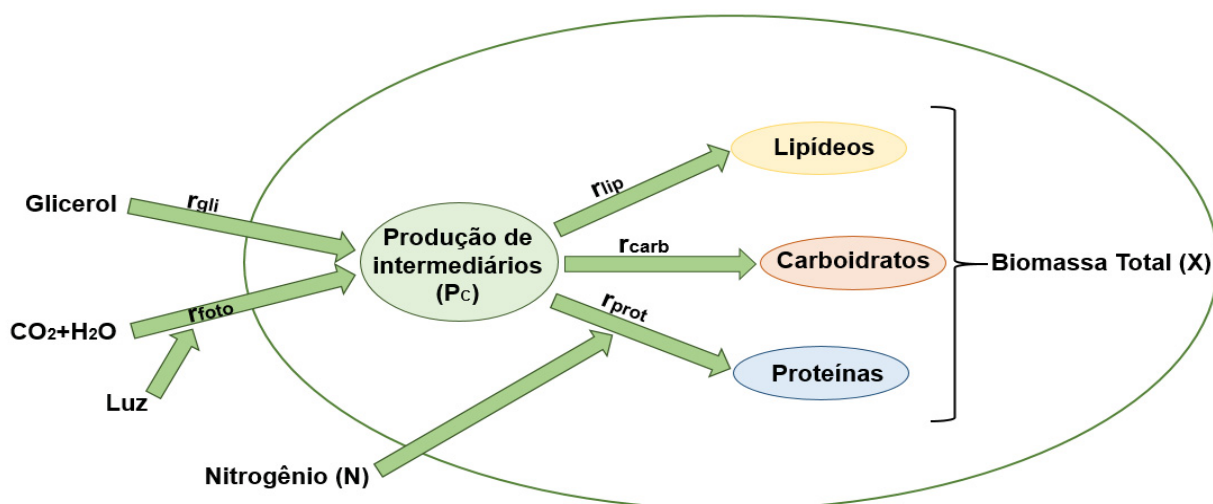
5.2 MODELO MATEMÁTICO

Baseados na Equação de Monod (1949), foram propostas nesta dissertação duas hipóteses para descrever o comportamento obtido no cultivo da microalga *Tetrademus obliquus*, a partir das condições descritas. No primeiro modelo matemático, apresentado no tópico 5.2.1, foi sugerida a hipótese de um fator logístico que limita a formação de biomassa e das macromoléculas (carboidratos, lipídeos e proteínas totais). No segundo modelo matemático, descrito no tópico 5.2.3, foi elaborada a hipótese do acúmulo de um composto de inibição a partir do glicerol, que inibi as mesmas variáveis apresentadas no modelo 1.

5.2.1 Elaboração da modelagem matemática utilizando a hipótese logística

Em consequência da complexidade dos mecanismos de formação dos metabólitos celulares a partir do metabolismo central, é necessária a elaboração de um modelo matemático simplificado para explicar a formação destes (BAROUKH et al., 2015a). Desta maneira, o modelo matemático confeccionado nesta dissertação utilizando a hipótese do fator logístico, propõe descrever simplificadaamente o mecanismo de acúmulo de biomassa, lipídeos, carboidratos e proteínas totais em regime foto autotrófico e mixotrófico, utilizando como substrato a glicerina a partir dos intermediários de carbono. Na Figura 12 é apresentado um diagrama esquemático do sistema.

Figura 12 – MECANISMO DE ACÚMULO DAS MACROMOLÉCULAS E BIOMASSA NA CÉLULA



FONTE: A autora (2019).

As hipóteses para formulação deste modelo consideram:

- Todo o metabolismo é representado pelo diagrama;
- O sistema total (intra e extracelular) possui uma distribuição homogênea de nutrientes e metabólitos;
- Os produtos finais do metabolismo (carboidratos, lipídeos e proteínas totais) compõem o acúmulo da biomassa;
- A biomassa apresenta um crescimento logístico.

O modelo matemático parte da constatação que os dados experimentais de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas totais apresentam um comportamento logístico. Dessa forma, todas as equações vão ter um fator logístico representado por F_{\log} .

$$F_{\log} = \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (9)$$

Em que X é a concentração de biomassa seca e X_{\max} é a concentração máxima de biomassa.

Como pode ser observado na Figura 12, a fotossíntese ocorre a partir do CO_2 disponível no meio de cultura e da luz incidente. A equação 10 descreve a velocidade que ocorre a fotossíntese.

$$r_{\text{foto}} = \frac{F_{\log} \mu_{\text{foto}} [\text{CO}_2] X}{K_{\text{co}_2} + [\text{CO}_2]} \quad (10)$$

Em que μ_{foto} é a velocidade máxima da fotossíntese, $[\text{CO}_2]$ é a concentração de dióxido de carbono no meio e K_{CO_2} é a constante de saturação do CO_2 .

Ainda, considerando o meio enriquecido com glicerol, a velocidade de absorção do tri-álcool é descrita através da equação 11.

$$r_{\text{gli}} = \frac{F_{\log} \mu_{\text{gli}} c_{\text{gli}} X}{K_{\text{gli}} + c_{\text{gli}}} \quad (11)$$

Em que μ_{gli} é a velocidade máxima de absorção do glicerol, c_{gli} é a concentração do glicerol e K_{gli} é a constante de saturação do glicerol no meio.

Por hipótese como mostra o diagrama esquemático, tanto o carbono fixado na fotossíntese quanto o glicerol absorvido são transformados em intermediários de reserva, mencionados anteriormente como intermediários de carbono (P_c), que podem ser convertidos em macromoléculas. Neste contexto, a síntese de proteínas depende também da concentração do nitrogênio no meio de cultura. Os fenômenos para a velocidade de formação dos lipídeos, carboidratos e proteínas, são representados pelas equações 12, 13 e 14, respectivamente.

$$r_{lip} = \frac{F_{log} \mu_{lip} P_c X}{(K_{lip} + P_c)} \quad (12)$$

Em que μ_{lip} é a velocidade máxima da formação de lipídeos e K_{lip} é a constante de saturação da formação de lipídios.

$$r_{carb} = \frac{F_{log} \mu_{carb} P_c X}{(K_{carb} + P_c)} \quad (13)$$

Em que μ_{carb} é a velocidade máxima da formação de carboidratos e K_{carb} é a constante de saturação de carboidratos.

$$r_{prot} = \frac{F_{log} \mu_{prot} P_c X N}{(K_{prot} + P_c)(K_{NH_3} + N)} \quad (14)$$

Em que μ_{prot} é a velocidade máxima da formação de proteínas, K_{prot} é a constante de saturação da formação de proteínas, K_{NH_3} é a constante de saturação do efeito da amônia na produção de proteína e N corresponde à concentração de nitrogênio no meio.

Considerando o ar comprimido inserido no cultivo, a concentração de equilíbrio do CO_2 no meio de cultura é descrita através da Lei de Henry, apresentada pela equação 15.

$$[\text{CO}_2]^* = H_{\text{CO}_2} P_{\text{CO}_2} \quad (15)$$

Onde H_{CO_2} é a constante de Henry e P_{CO_2} é a pressão parcial de CO_2 no ar.

5.2.1.1 Equações diferenciais

A partir das equações anteriores, foi realizado o balanço de massa para cada componente do modelo. Desta maneira, a taxa de acúmulo do gás carbônico no meio de cultura é apresentada de acordo com a equação 16.

$$\frac{d[\text{CO}_2]}{dt} = K_{\text{la}}([\text{CO}_2]^* - [\text{CO}_2]) - Y_{\text{CO}_2/P_c} r_{\text{foto}} \quad (16)$$

Em que K_{la} é o coeficiente de transferência de massa, $[\text{CO}_2]^*$ é a concentração de equilíbrio do ar injetado, $[\text{CO}_2]$ é a concentração de CO_2 no meio líquido, Y_{CO_2/P_c} é coeficiente de rendimento de CO_2 para P_c (ou seja, quantas gramas de CO_2 será utilizado para produzir 1 g de carbono intermediário).

A equação 17 apresenta a taxa de acúmulo do glicerol.

$$\frac{d[c_{\text{gli}}]}{dt} = - Y_{\text{C}_{\text{gli}}/P_c} r_{\text{gli}} \quad (17)$$

Onde $Y_{\text{C}_{\text{gli}}/P_c}$ é a constante que representa a conversão do glicerol nos intermediários de carbono.

O balanço de massa para os intermediários de reserva é apresentado pela equação 18.

$$\frac{dP_c}{dt} = r_{\text{foto}} + r_{\text{gli}} - Y_{P_c/[lip]} r_{lip} - Y_{P_c/[carb]} r_{carb} - Y_{P_c/[prot]} r_{prot} \quad (18)$$

Em que $Y_{P_c/[lip]}$ é o coeficiente de conversão dos intermediários de carbono em lipídios, $Y_{P_c/[carb]}$ é o coeficiente da conversão dos intermediários de carbono em

carboidratos e $Y_{P_c/[prot]}$ é o coeficiente da conversão dos intermediários de carbono em proteínas.

A taxa de acúmulo da formação dos lipídios, carboidratos e proteínas é definida pelas equações 19, 20 e 21, respectivamente.

$$\frac{d[lip]}{dt} = r_{lip} \quad (19)$$

Onde a taxa de formação dos lipídeos é representada pela velocidade de formação dos lipídeos.

$$\frac{d[carb]}{dt} = r_{carb} \quad (20)$$

Onde a taxa de formação dos carboidratos é representada pela velocidade de formação dos carboidratos.

$$\frac{d[prot]}{dt} = r_{prot} \quad (21)$$

Onde a taxa de formação das proteínas é representada pela velocidade de formação das proteínas.

A taxa de consumo do nitrogênio é descrita na equação 22.

$$\frac{d[N]}{dt} = -Y_{N/[prot]} r_{prot} \quad (22)$$

Em que $Y_{N/[prot]}$ é o coeficiente de conversão do nitrogênio em proteínas.

Desta maneira, a partir do exposto, a taxa de produção da biomassa depende da formação de lipídios, carboidratos e proteínas apresentada pela equação 23.

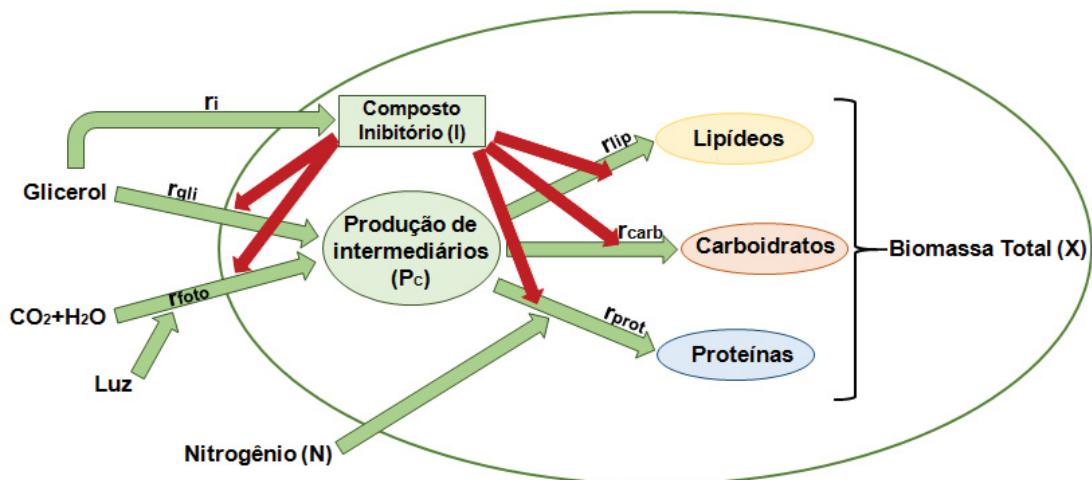
$$\frac{d[X]}{dt} = (r_{lip} + r_{carb} + r_{prot}) Y_X \quad (23)$$

Para resolução do equacionamento apresentado no modelo, foi utilizado o programa MATLAB® e a subrotina ode23s.

5.2.2 Elaboração da modelagem matemática utilizando a hipótese da inibição pelo glicerol

Devido à complexidade do sistema, ainda considerando as simplificações designadas no modelo matemático descrito anteriormente com relação ao metabolismo central, outra hipótese relacionada à inibição da formação de biomassa e das macromoléculas foi sugerida na realização deste trabalho. Na Figura 13 é apresentado um diagrama esquemático do sistema.

Figura 13 – MECANISMO DE ACÚMULO DAS MACROMOLÉCULAS E DA BIOMASSA NA CÉLULA



FONTE: A autora (2019).

As hipóteses para formulação deste modelo consideram:

- Todo o metabolismo é representado pelo diagrama;
- O sistema total (intra e extracelular) possui uma distribuição homogênea de nutrientes e metabólitos;
- Os produtos finais do metabolismo (carboidratos, lipídeos e proteínas totais) compõem o acúmulo da biomassa;
- Ocorre a formação de um composto I a partir do glicerol que inibe todo o metabolismo celular considerado.

A partir do comportamento dos dados experimentais, surge a hipótese da formação de um composto que inibe o metabolismo celular (I), sendo este oriundo do glicerol. Neste sentido, a formação de biomassa, carboidratos, lipídios e proteínas são parcialmente reduzidas. A equação 24 apresenta a velocidade de produção do composto I.

$$r_i = \frac{\mu_i c_{gli} X}{(K_i + c_{gli})} \quad (24)$$

Em que μ_i é a velocidade máxima da formação do composto I, c_{gli} é a concentração de glicerol do meio e K_i é a constante de saturação do composto I.

O composto I inibe o metabolismo celular na velocidade que pode ser descrita pela equação 25.

$$T_n = \frac{K_{ign}}{K_{ign} + I} \quad (25)$$

Em que n é atribuído os valores de 1 à 5, onde 1 corresponde a fotossíntese, 2 ao glicerol, 3 aos lipídeos, 4 aos carboidratos e 5 as proteínas, sendo I a concentração do inibidor gerado a partir do glicerol.

Como pode ser observada, a fotossíntese ocorre a partir do CO_2 disponível no meio de cultura e da luz incidente. A equação 26 descreve a velocidade que ocorre a fotossíntese.

$$r_{foto} = \frac{T_1 \mu_{foto} [CO_2] X}{K_{co_2} + [CO_2]} \quad (26)$$

Em que μ_{foto} é a velocidade máxima da fotossíntese, $[CO_2]$ é a concentração de dióxido de carbono no meio e K_{CO_2} é a constante de saturação do CO_2 .

Ainda, considerando o meio enriquecido com glicerol, a velocidade de absorção do tri-álcool é descrita através da equação 27.

$$r_{gli} = \frac{T_2 \mu_{gli} c_{gli} X}{K_{gli} + c_{gli}} \quad (27)$$

Em que μ_{gli} é a velocidade máxima da absorção do glicerol, c_{gli} é a concentração do glicerol e K_{gli} é a constante de saturação do glicerol no meio.

Por hipótese como mostra o diagrama esquemático, tanto o carbono fixado na fotossíntese quanto o glicerol absorvido são transformados em intermediários de reserva, mencionados anteriormente como intermediários de carbono (P_c), que podem ser convertidos em macromoléculas. Neste contexto, a síntese de proteínas depende também da concentração do nitrogênio no meio de cultura. Os fenômenos para a velocidade de formação dos lipídeos, carboidratos e proteínas, são representados pelas equações 28, 29 e 30, respectivamente.

$$r_{lip} = \frac{T_3 \mu_{lip} P_c X}{(K_{lip} + P_c)} \quad (28)$$

Em que μ_{lip} é a velocidade máxima da formação de lipídeos e K_{lip} é a constante de saturação da formação de lipídios.

$$r_{carb} = \frac{T_4 \mu_{carb} P_c X}{(K_{carb} + P_c)} \quad (29)$$

Em que μ_{carb} é a velocidade máxima da formação de carboidratos e K_{carb} é a constante de saturação de carboidratos.

$$r_{prot} = \frac{T_5 \mu_{prot} P_c X N}{(K_{prot} + P_c)(K_{NH_3} + N)} \quad (30)$$

Em que μ_{prot} é a velocidade máxima da formação de proteínas, K_{prot} é a constante de saturação da formação de proteínas, K_{NH_3} é a constante de saturação do efeito da amônia na produção de proteína e N corresponde à concentração de nitrogênio no meio.

Considerando o ar comprimido inserido no cultivo, a concentração de equilíbrio do CO₂ no meio de cultura é descrita através da Lei de Henry, apresentada pela equação 31.

$$[\text{CO}_2]^* = H_{\text{CO}_2} P_{\text{CO}_2} \quad (31)$$

Onde H_{CO_2} é a constante de Henry e P_{CO_2} é a pressão parcial de CO₂ no ar.

5.2.2.1 Equações diferenciais do modelo

A partir das equações anteriores, foi realizado o balanço de massa para cada componente do modelo. Desta maneira, a taxa de acúmulo do gás carbônico no meio de cultura é apresentada de acordo com a equação 32.

$$\frac{d[\text{CO}_2]}{dt} = K_{\text{la}} ([\text{CO}_2]^* - [\text{CO}_2]) - Y_{\text{CO}_2/P_c} r_{\text{foto}} \quad (32)$$

Em que K_{la} é o coeficiente de transferência de massa, $[\text{CO}_2]^*$ é a concentração de equilíbrio do ar injetado, $[\text{CO}_2]$ é a concentração de CO₂ no meio líquido, Y_{CO_2/P_c} é o coeficiente de rendimento de CO₂ para P_c (ou seja, quantas gramas de CO₂ será utilizado para produzir 1 g de carbono intermediário).

A equação 33 apresenta a taxa de acúmulo do glicerol.

$$\frac{d[c_{\text{gli}}]}{dt} = - Y_{\text{C}_{\text{gli}}/P_c} r_{\text{gli}} - r_i \quad (33)$$

Onde $Y_{\text{C}_{\text{gli}}/P_c}$ é o coeficiente que representa a conversão do glicerol nos intermediários de carbono.

O balanço de massa para os intermediários de reserva é apresentado pela equação 34.

$$\frac{dP_c}{dt} = r_{\text{foto}} + r_{\text{gli}} - Y_{P_c/[lip]} r_{\text{lip}} - Y_{P_c/[carb]} r_{\text{carb}} - Y_{P_c/[prot]} r_{\text{prot}} \quad (34)$$

Em que $Y_{P_c/[lip]}$ é o coeficiente de conversão dos intermediários de carbono em lipídios, $Y_{P_c/[carb]}$ é o coeficiente da conversão dos intermediários de carbono em carboidratos e $Y_{P_c/[prot]}$ é o coeficiente da conversão dos intermediários de carbono em proteínas.

A taxa de acúmulo da formação dos lipídios, carboidratos e proteínas é definida pelas equações 35, 36 e 37, respectivamente.

$$\frac{d[lip]}{dt} = r_{lip} \quad (35)$$

Onde a taxa de formação dos lipídeos é representada pela velocidade de formação dos lipídeos.

$$\frac{d[carb]}{dt} = r_{carb} \quad (36)$$

Onde a taxa de formação dos carboidratos é representada pela velocidade de formação dos carboidratos.

$$\frac{d[prot]}{dt} = r_{prot} \quad (37)$$

Onde a taxa de formação das proteínas é representada pela velocidade de formação das proteínas.

A taxa de consumo do nitrogênio é descrita na equação 38.

$$\frac{d[N]}{dt} = -Y_{N/[prot]} r_{prot} \quad (38)$$

Em que $Y_{N/[prot]}$ é o coeficiente de conversão do nitrogênio em proteínas.

Desta maneira, a partir do exposto, a taxa de produção da biomassa depende da formação de lipídios, carboidratos e proteínas apresentada pela equação 39.

$$\frac{d[X]}{dt} = (r_{lip} + r_{carb} + r_{prot})Y_X \quad (39)$$

Ainda, a taxa de formação do composto de inibição (I) é descrita pela equação 40.

$$\frac{dI}{dt} = r_i \quad (40)$$

Para resolução do equacionamento apresentado no modelo, foi utilizado o programa MATLAB® e a subrotina ode23s.

5.3 CONDIÇÕES INICIAIS DO MODELO MATEMÁTICO

As concentrações iniciais dos componentes considerados nas equações diferenciais constam na Tabela 6.

Tabela 6 - CONDIÇÕES INICIAIS DOS COMPONENTES CONSIDERADOS NO MODELO

| Componentes (g.L⁻¹) | Mixotrófico | Foto autotrófico |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| CO ₂ | 0,006 | 0,006 |
| Lipídeos | 0,0473 | 0,0298 |
| Carboidratos | 0,0508 | 0,0275 |
| Proteínas | 0,1621 | 0,1426 |
| P _C | 0,02 | 0,02 |
| NH ₃ | 0,2 | 0,2 |
| Biomassa | 0,3461 | 0,3028 |
| Glicerol | 4,3 | 0 |
| Composto de inibição | 0,5 | 0 |

FONTE: A autora (2019).

5.4 AJUSTE DOS MODELOS MATEMÁTICOS E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DO MODELO DA HIPÓTESE LOGÍSTICA

Para o ajuste dos parâmetros dos modelos matemáticos foi considerada a função objetiva (F_{obj}) descrita na equação 41 (FIGUEROA-TORRES; PITTMAN; THEODOROPOULOS, 2017).

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{n_{exp}} \left(\frac{(\text{teórico}(i) - \text{exp}(i))}{\text{exp}(i)} \right)^2 \quad (41)$$

Em que n_{exp} corresponde ao número de experimentos, i ao número de pontos experimentais (32 ao todo), $\text{teórico}(i)$ aos dados teóricos obtidos na simulação e $\text{exp}(i)$ aos dados coletados no experimento.

Os valores foram normalizados em consequência das medidas serem discrepantes. Para resolução do modelo, foi utilizado o método de Nelder-Mead através da rotina `Fminsearch` e subrotina `ode23s` no software MATLAB® 2018.

5.3.1 Modelo matemático da hipótese logística

O modelo matemático da hipótese logística possui o total de 15 parâmetros e para o ajuste, os valores inicialmente adicionados para cada parâmetro corresponderam a 1. O ajuste dos parâmetros do modelo matemático foi realizado a partir do conjunto de dados coletados no experimento cultivado em regime mixotrófico e a descrição de cada parâmetro é apresentada na Tabela 7.

Após definir e realizar o ajuste dos parâmetros do experimento contendo glicerol, o modelo matemático foi validado através dos dados do cultivo em meio foto autotrófico, ou seja, foi simulado os valores deste regime com as constantes obtidas durante a etapa de ajuste do modelo matemático, exceto para concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$), em que foi considerado o valor obtido no experimento controle.

Tabela 7 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A SIMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO.

| Parâmetros | Descrição | Unidade de medida |
|--------------|---|-------------------|
| μ_{foto} | Velocidade específica máxima da fotossíntese | dia ⁻¹ |
| K_{sco2} | Constante de saturação do CO ₂ | g.L ⁻¹ |
| μ_{lip} | Velocidade específica máxima da produção de lipídios | dia ⁻¹ |
| K_{slip} | Constante de saturação da produção de lipídeos | g.L ⁻¹ |
| μ_{carb} | Velocidade específica máxima da produção de carboidratos | dia ⁻¹ |
| K_{scarb} | Constante de saturação da produção de carboidratos | g.L ⁻¹ |
| μ_{prot} | Velocidade específica máxima da produção de proteínas | dia ⁻¹ |
| K_{sprot} | Constante de saturação do efeito do P _C na produção de proteína | g.L ⁻¹ |
| K_{sNH3} | Constante de saturação do efeito da amônia na produção de proteína | g.L ⁻¹ |
| K_{la} | Coefficiente de transferência de massa do CO ₂ do ar para o meio | dia ⁻¹ |
| Y_x | Coefficiente de rendimento da biomassa | g.g ⁻¹ |
| μ_{gli} | Velocidade específica máxima da absorção de glicerol | dia ⁻¹ |
| K_{gli} | Constante de saturação da absorção de glicerol | g.L ⁻¹ |
| X_{max} | Concentração máxima de biomassa | g.L ⁻¹ |

FONTE: a autora (2019).

5.3.2 Modelo matemático da hipótese da formação do composto I

O modelo matemático da inibição pelo glicerol possui o total de 20 parâmetros, em que os valores iniciais para obtenção de cada parâmetro corresponderam a 1. A descrição de cada parâmetro é apresentada na Tabela 8.

Para este modelo foi realizado apenas o ajuste dos parâmetros definidos inicialmente utilizando ambos os dados experimentais do cultivo mixotrófico e foto autotrófico para calibração dos parâmetros. Neste modelo matemático não foi realizada a validação experimental. Gradualmente a função objetivo foi sendo multiplicada por um fator de 10 conforme o valor absoluto da função objetivo era menor que uma unidade.

Tabela 8 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A SIMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO.

| Parâmetros | Descrição | Unidade de medida |
|---------------------|---|-------------------|
| μ_{foto} | Velocidade específica máxima da fotossíntese | dia ⁻¹ |
| K_{sco2} | Constante de saturação do CO ₂ | g.L ⁻¹ |
| μ_{lip} | Velocidade específica máxima da produção de lipídios | dia ⁻¹ |
| K_{slip} | Constante de saturação da produção de lipídeos | g.L ⁻¹ |
| μ_{carb} | Velocidade específica máxima da produção de carboidratos | dia ⁻¹ |
| K_{scarb} | Constante de saturação da produção de carboidratos | g.L ⁻¹ |
| μ_{prot} | Velocidade específica máxima da produção de proteínas | dia ⁻¹ |
| K_{sprot} | Constante de saturação do efeito do P _C na produção de proteína | g.L ⁻¹ |
| K_{sNH3} | Constante de saturação do efeito da amônia na produção de proteína | g.L ⁻¹ |
| K_{la} | Coefficiente de transferência de massa do CO ₂ do ar para o meio | dia ⁻¹ |
| Y_x | Coefficiente de rendimento da biomassa | g.g ⁻¹ |
| μ_{gli} | Velocidade específica máxima da absorção de glicerol | dia ⁻¹ |
| K_{gli} | Constante de saturação da absorção de glicerol | g.L ⁻¹ |
| K_{ig1} | Constante de inibição da fotossíntese pelo composto I | g.L ⁻¹ |
| K_{ig2} | Constante de inibição da absorção do glicerol pelo composto I | g.L ⁻¹ |
| K_{ig3} | Constante de inibição da síntese de lipídeos pelo composto I | g.L ⁻¹ |
| K_{ig4} | Constante de inibição da síntese de carboidratos pelo composto I | g.L ⁻¹ |
| K_{ig5} | Constante de inibição da síntese de proteínas pelo composto I | g.L ⁻¹ |
| μ_i | Velocidade específica máxima da produção do composto I | dia ⁻¹ |
| K_i | Constante de saturação da produção do composto I | g.L ⁻¹ |

FONTE: a autora (2019).

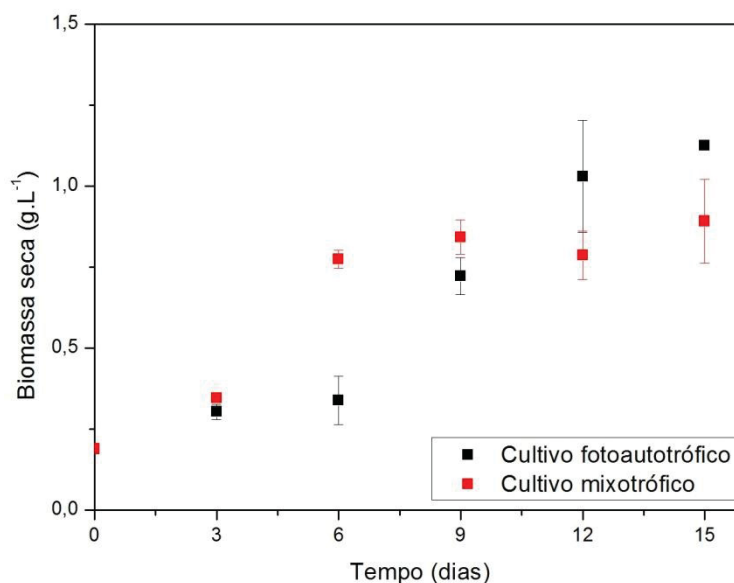
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tópicos para apresentação dos resultados são divididos em três seções. A seção 6.1 descreve a discussão referente à etapa experimental em que foram analisados os valores da concentração de biomassa seca, densidade celular, absorvância e pH do cultivo. Na seção 6.2 é realizada a análise da concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas totais obtidas, assim como as respectivas produtividades de cada metabólito, demonstrando o período adequado para obtenção da biomassa, buscando reduzir o tempo de cultivo das microalgas e os custos relacionados à produção. A seção 6.3 apresenta a relação dos resultados da simulação com os dados experimentais, sendo o tópico 6.3.1 referente ao modelo com a hipótese do fator logístico e o tópico 6.3.2, sobre o modelo da hipótese da formação do composto I. Finalizando na seção 6.4, ambos os modelos são comparados evidenciando aspectos interessantes e gargalos de cada um, assim como a importância da ferramenta da modelagem matemática na previsão do comportamento de microrganismos para cultivos em maior escala, sugerindo possíveis extensões dos modelos e aplicação dos metabólitos de interesse.

6.1 DADOS EXPERIMENTAIS DOS CULTIVOS

Considerando a importância do controle no cultivo das microalgas para avaliar o desenvolvimento, foram coletados a cada três dias os dados nas diferentes condições, como descrito no item 5.1.3.1. No experimento foto autotrófico utilizado como controle, é possível observar uma maior formação de biomassa seca com relação ao cultivado em meio mixotrófico. O início da fase estacionária não foi observado durante a realização do experimento no regime foto autotrófico, enquanto no mixotrófico, ocorreu no intervalo dos dias 3 e 6, sendo o máximo de biomassa obtida para cada condição $1,1248 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,8912 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Portanto, surge a hipótese da contaminação oriunda do ar comprimido utilizado para aeração do meio, que será discutida posteriormente. A Figura 14 apresenta o acúmulo de biomassa seca da microalga cultivada no controle e com adição do glicerol.

Figura 14 - BIOMASSA SECA COLETADA DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO



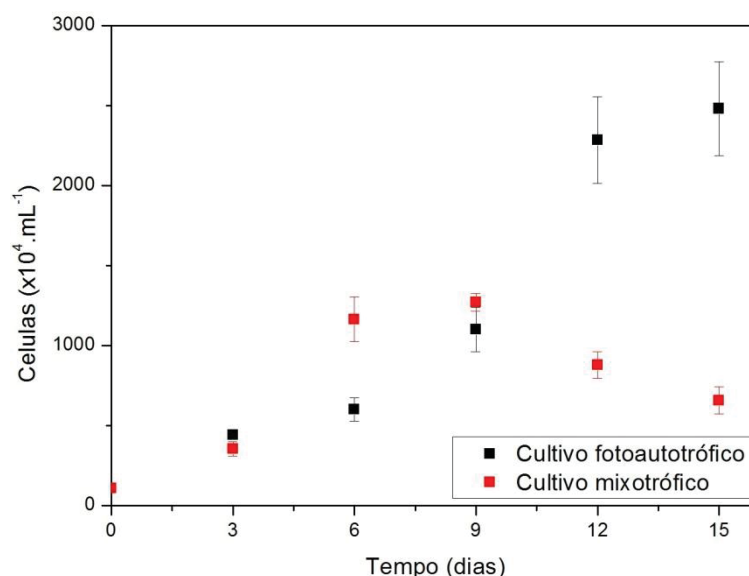
FONTE: A autora (2019).

Na literatura, a concentração de biomassa para espécie cultivada adicionando 5 g.L⁻¹ do glicerol correspondeu a 2,15 g.L⁻¹ em meio BG11 modificado (ANDRULEVICIUTE et al., 2013) e 1,92 g.L⁻¹ utilizando meio Jaworski (JM), que além da adição do tri-álcool, também acrescentou CO₂ na vazão de 0,74 L.min⁻¹ (CHOI; YU, 2015), sendo importante destacar que a concentração do inóculo inicial para cada autor foi 0,287 e 0,367 g.L⁻¹, valor superior ao utilizado na presente pesquisa que empregou 0,1881 ± 0,0056 g.L⁻¹. A maior concentração de biomassa para os autores pode ser devido ao fato do meio BG11 empregado por Andruleviciute et al. (2013) apresentar maior concentração de nitrato em relação ao meio CHU, permitindo a divisão celular por mais tempo. Para Choi e Yu (2015), a adição do CO₂ como fonte de carbono inorgânico juntamente com o glicerol contribuiu de forma significativa para a fotossíntese e aumento das células, visto que, no presente trabalho foi utilizado ar comprimido que apresenta menores proporções deste composto.

Com relação aos dados obtidos no experimento, observando os valores de biomassa seca de ambos os cultivos no sexto dia, é notória a diferença no aumento do mixotrófico com relação ao foto autotrófico, sendo ainda perceptível o início da fase estacionária no primeiro. Por consequência, uma das hipóteses consideradas é que apesar da alta disponibilidade de carbono orgânico devido à presença do

glicerol, considerando que o meio sintético utilizado nas culturas não foi suplementado com nitrogênio e fósforo, as concentrações destes dois compostos foram reduzidas no decorrer do tempo. Portanto, devido a necessidade do primeiro para a multiplicação celular (SHUNNI et al. 2016), pode ter ocorrido a inibição da divisão, ocasionando o início da fase estacionária como observado na Figura 15, que apresenta o crescimento das células no cultivo foto autotrófico e mixotrófico.

Figura 15 – NÚMERO DE CELULAS COLETADAS DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO

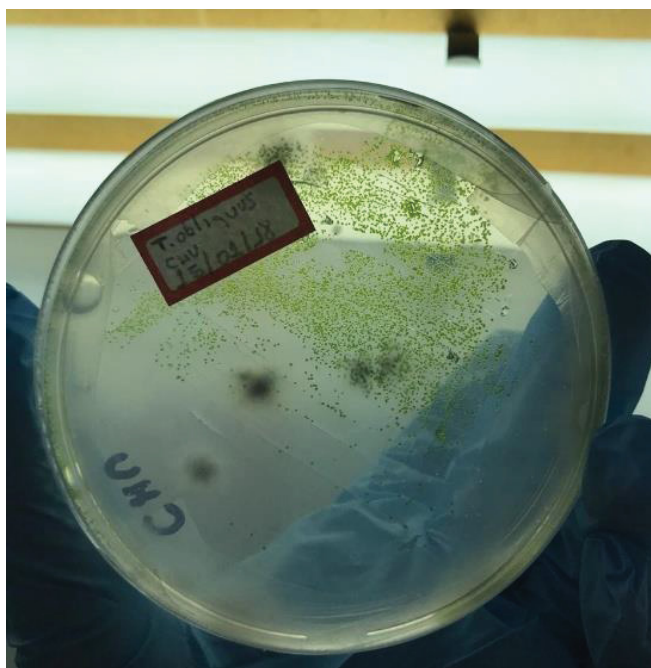


FONTE: A autora (2019).

Contudo, apesar da razão C:N ser inadequada no meio devido à não suplementação de nitrogênio e adição de glicerol, este fato não justifica a redução da concentração da biomassa seca. A partir da realização do plaqueamento do regime mixotrófico em meio ágar, foi constatada a contaminação causada por microrganismos possivelmente oriundos do ambiente externo presentes no ar comprimido, utilizado para a aeração no sistema de cultivo. A presença de fungos foi corroborada conforme demonstrado na Figura 16. Segundo Fott (1967) e Ilkov (1975) a contaminação com o quitrídio *Phlyctidium scenedesmi* ocasionou uma menor produção da alga *Scenedesmus* em lagoas abertas e de acordo com a literatura, devido aos sistemas de cultivo em escala piloto e industrial utilizarem uma cultura unialgal, a presença dos fungos pode ocasionar a redução das microalgas no

meio, acarretando impactos econômicos na produção de biomassa (CARNEY; LANE, 2014).

Figura 16 - CRESCIMENTO DO CULTIVO MIXOTRÓFICO EM PLACA DE PETRI

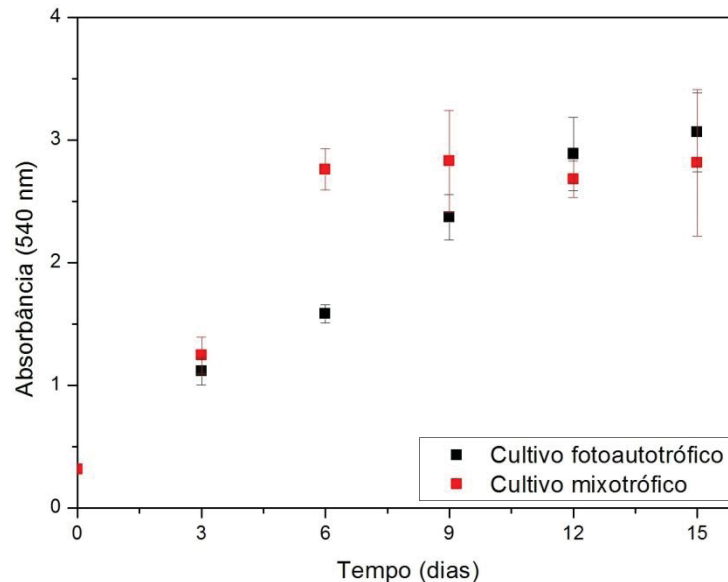


Fonte: A autora (2019).

A contagem celular no cultivo foto autotrófico atingiu o máximo de $2480 \pm 294 \times 10^4$ cel.mL⁻¹ no 15º dia. Em contra partida, o intervalo entre os dias 6 e 9 no regime com adição de glicerol obteve o maior número de células, sendo 1270 ± 56 cel.mL⁻¹ e após, iniciou um declínio indicando a morte celular. Como resultado do crescimento e maior concentração da biomassa ocorreu o aumento da densidade do meio, acarretando na menor incidência de luz no interior do cultivo. Este fato pode ter influenciado no crescimento homogêneo das microalgas, mesmo na presença da aeração, pois, uma menor radiação ocasiona a baixa eficiência da fotossíntese e desta maneira, a célula passa a consumir o carbono disponível para exercer o funcionamento do metabolismo (LEHMUSKERO; CHAUTON; BOSTRÖM, 2018), reduzindo o acúmulo da biomassa. Assim, uma das alternativas é elevar a intensidade luminosa do sistema no decorrer do período, contudo, as microalgas presentes na parede do fotobiorreator tendem a receber uma maior radiação o que pode interferir no desenvolvimento destas (LEHMUSKERO; CHAUTON; BOSTRÖM, 2018; ZHUANG et al., 2018). Portanto, o valor da luminosidade neste experimento

foi mantido constante. A Figura 17 demonstra os valores de absorvância observados em diferentes intervalos no cultivo foto autotrófico e mixotrófico.

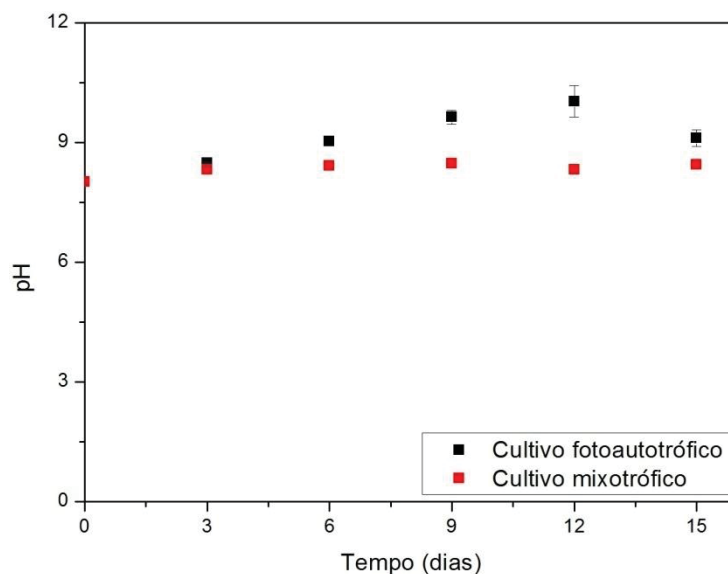
Figura 17 – VALORES DA ABSORBÂNCIA DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO



FONTE: A autora (2019).

A maior densidade constatada no cultivo das microalgas pode ser caracterizada pela condição de hiperplasia, que consiste no aumento da divisão celular, como também através da hipertrofia, na qual as células acumulam metabólitos de reserva aumentando o volume (RYU et al., 2018). Além disso, a eficiência da fotossíntese corresponde a formação de clorofila (ZHUANG et al., 2018) e este pigmento pode interferir na análise do desenvolvimento das microalgas, com relação ao aumento da intensidade da coloração. Além disso, é relatado na literatura que os microrganismos podem apresentar diferentes tamanhos em cada fase do cultivo, portanto, a concentração celular e a densidade podem não ser proporcionais (MONOD, 1949). Por este motivo, a DO deve estar associada a outras análises, para corroborar os dados obtidos. A Figura 18 apresenta o pH do cultivo foto autotrófico e mixotrófico nos diferentes períodos analisados.

Figura 18 – VALORES DO pH COLETADOS DURANTE O PERÍODO DE 15 DIAS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO



FONTE: A autora (2019).

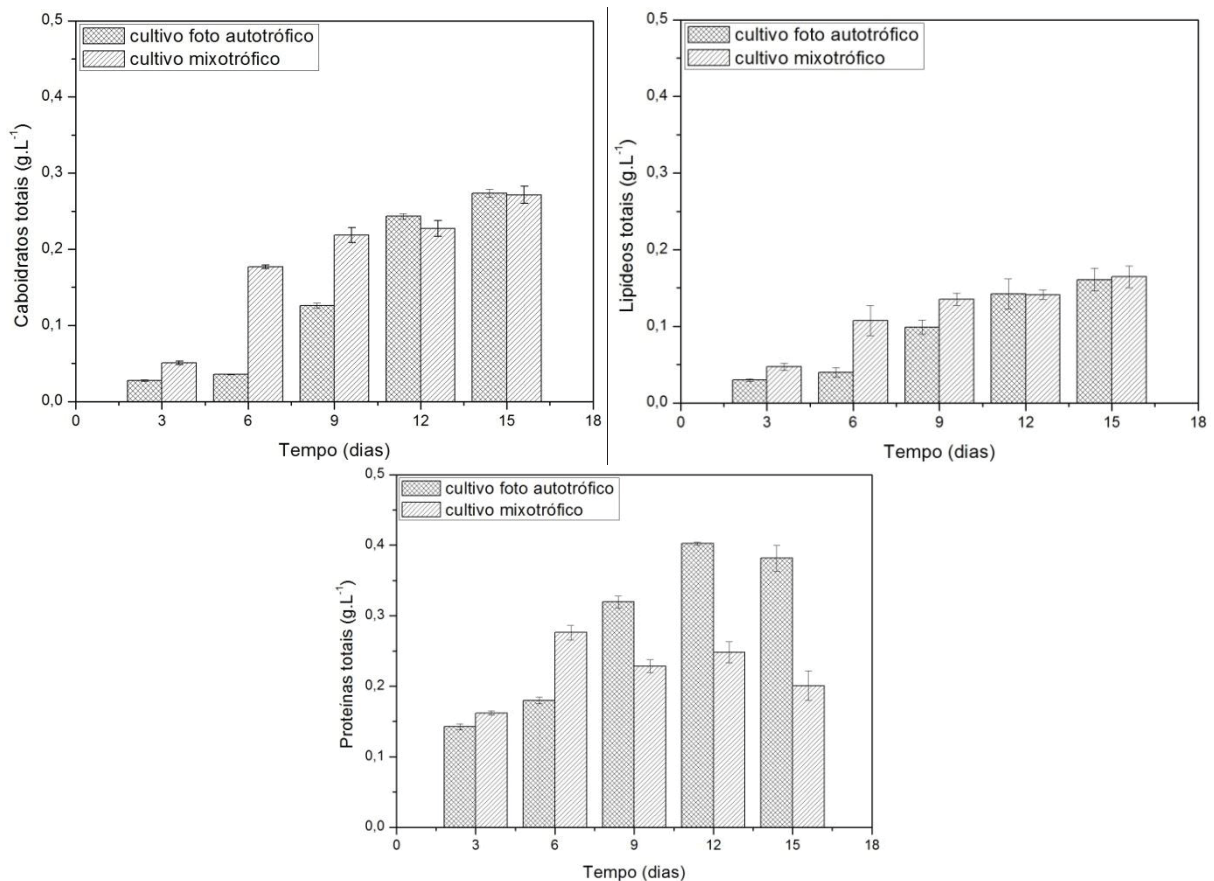
O aumento do pH está diretamente relacionado ao crescimento das microalgas (QIU et al., 2017). Neste contexto, o pH do inóculo inicial correspondeu a 8,01, sendo que no 15º dia ocorreu o maior valor constatado no meio foto autotrófico sendo $9,11 \pm 0,21$, indicando que neste o desenvolvimento celular foi favorecido em relação ao meio mixotrófico, que apresentou $\text{pH}=8,45 \pm 0,08$. Caso o valor do pH 9 não seja adequado para a multiplicação das microalgas, nesta faixa estes microrganismos formam um composto polimérico extracelular como proteção do meio externo (ZHUANG et al., 2018). Outro fenômeno, é a inibição causada na síntese de proteínas pelo pH alcalino, enquanto valores nesta faixa, estimulam a formação de polissacarídeos (YUAN et al., 2019).

6.2 ANÁLISE DA BIOMASSA: ACÚMULO DE METABÓLITOS E PRODUTIVIDADE

Na fase estacionária do cultivo das microalgas ocorre o acúmulo de metabólitos de reserva (LIAO et al., 2018) e portanto, utilizando o protocolo da análise de carboidratos totais descrito na seção 5.1.4.1, calculou-se a equação da reta por regressão linear empregando a relação entre absorbância e concentração, com $R^2=0,996$ obteve-se $y=0,04x+0,015$ e através desta, foi realizado o cálculo da concentração de carboidratos nos diferentes dias das condições cultivadas. A partir

dos procedimentos experimentais mencionados na metodologia, a concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas em regime mixotrófico e foto autotrófico são apresentadas na Figura 19.

Figura 19 - CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, LÍPIDEOS E PROTEÍNAS TOTAIS NA MICROALGA



FONTE: A autora (2019).

A concentração de carboidratos demonstrou aumento acentuado no intervalo entre os dias 6 e 9 para o cultivo em regime mixotrófico com relação ao foto autotrófico. Este fato pode ser justificado em consequência da presença do glicerol no meio, que proporciona um aumento na razão C:N, contribuindo para o acúmulo de carboidratos e lipídeos (ZHAN; HONG; HU, 2016, CHENG et al., 2009). Além disso, os carboidratos atuam como um composto de armazenamento para a síntese lipídica na presença de concentrações menores ou inibição de nitrogênio (KONG et al., 2013), sugerindo o consumo da maior quantidade deste nutriente na fase inicial do cultivo com glicerol, pois, analisando a concentração de proteínas no meio

mixotrófico, é verificado o decréscimo destas após o 6° dia, enquanto para os carboidratos este comportamento não é observado.

Após analisar o acúmulo dos metabólitos, foi calculada a produtividade da biomassa e das macromoléculas, visando à realização de cultivos em escala industrial que possam ser utilizados para aplicações biotecnológicas, como a extração lipídica e posterior aproveitamento da biomassa residual para produção de etanol. A Tabela 9 apresenta a produtividade de biomassa, carboidratos, lipídios e proteínas totais no regime foto autotrófico.

Tabela 9 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E MACROMOLÉCULAS NO MEIO FOTO AUTOTRÓFICO

| Intervalo de tempo (dias) | Biomassa | Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) | | |
|---------------------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | | Carboidratos | Lipídeos | Proteínas |
| 0-3 | 0,0382 ± 0,0079 | 0,0033 ± 0,0004 | 0,0029 ± 0,0006 | 0,0174 ± 0,0014 |
| 3-6 | 0,0250 ± 0,0125 | 0,0030 ± - | 0,0031 ± 0,0010 | 0,0149 ± 0,0008 |
| 6-9 | 0,0593 ± 0,0063 | 0,0120 ± 0,0004 | 0,0086 ± 0,0010 | 0,0255 ± 0,0009 |
| 9-12 | 0,0701 ± 0,0144 | 0,0188 ± 0,0003 | 0,0101 ± 0,0016 | 0,0260 ± 0,0002 |
| 12-15 | 0,0625 ± 0,0007 | 0,0171 ± 0,0003 | 0,0093 ± 0,0010 | 0,0194 ± 0,0012 |

Fonte: A autora (2019).

Os valores de produtividade obtidos para todos os componentes analisados no cultivo foto autotrófico, demonstram um valor crescente até o intervalo dos dias 9 e 12, sendo após este período constatada a redução dos valores. Barbera et al. (2016) observaram que a menor concentração de P, N e micronutrientes, ocasionam a redução da produtividade da espécie *Scenedesmus* sp., sugerindo que o decréscimo no presente experimento é consequência da diluição dos nutrientes no cultivo, devido ao consumo pelas microalgas. Após os resultados obtidos no meio controle, é possível identificar o aumento em relação à produtividade de biomassa e das macromoléculas no meio mixotrófico com adição de glicerol, apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – VALORES DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS DO CULTIVO MIXOTRÓFICO.

| Intervalo de tempo (dias) | Biomassa | Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹) | | Proteínas |
|---------------------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | | Carboidratos | Lipídeos | |
| 0-3 | 0,0527 ± 0,0044 | 0,0110 ± 0,0008 | 0,0087 ± 0,0015 | 0,0239 ± 0,0010 |
| 3-6 | 0,0976 ± 0,0046 | 0,0266 ± 0,0004 | 0,0144 ± 0,0033 | 0,0309 ± 0,0017 |
| 6-9 | 0,0727 ± 0,0058 | 0,0223 ± 0,0011 | 0,0127 ± 0,0009 | 0,0153 ± 0,0010 |
| 9-12 | 0,0499 ± 0,0062 | 0,0175 ± 0,0009 | 0,0100 ± 0,0005 | 0,0131 ± 0,0013 |
| 12-15 | 0,0469 ± 0,0086 | 0,0169 ± 0,0008 | 0,0096 ± 0,0009 | 0,0074 ± 0,0014 |

FONTE: A autora (2019).

O intervalo de tempo com maior produtividade de biomassa, carboidratos, lipídios e proteínas totais no regime mixotrófico foi entre o 3º e o 6º dia, sendo aproximadamente 3,90; 8,87; 4,65 e 2,07 vezes maior que o controle, respectivamente, neste mesmo período. Através dos resultados do experimento com a microalga *Tetrademus obliquus*, é obtido o intervalo mais adequado para a interrupção da cultura nas condições realizadas, proporcionando assim o melhor aproveitamento da biomassa e possibilitando reduzir o tempo da produção no processo.

6.3 MODELOS MATEMÁTICOS

Os modelos matemáticos desenvolvidos considerando a hipótese logística e a hipótese da formação do composto de inibição a partir do glicerol, foram implementados em MATLAB® com sucesso, apresentando um baixo tempo computacional.

6.3.1 Hipótese logística: Ajuste e validação experimental

No modelo da hipótese logística, após o ajuste dos parâmetros por otimização utilizando inicialmente o conjunto de dados do experimento em condição mixotrófica, foi possível descrever os dados experimentais apresentados anteriormente. A Tabela 11 demonstra os valores encontrados no ajuste dos parâmetros realizado no MATLAB®.

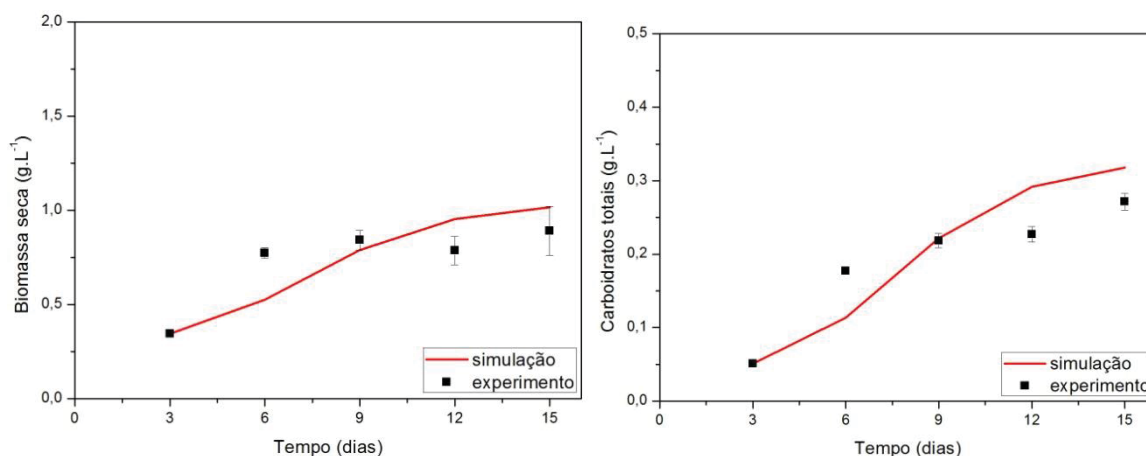
Tabela 11 – VALORES DOS PARÂMETROS ENCONTRADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO.

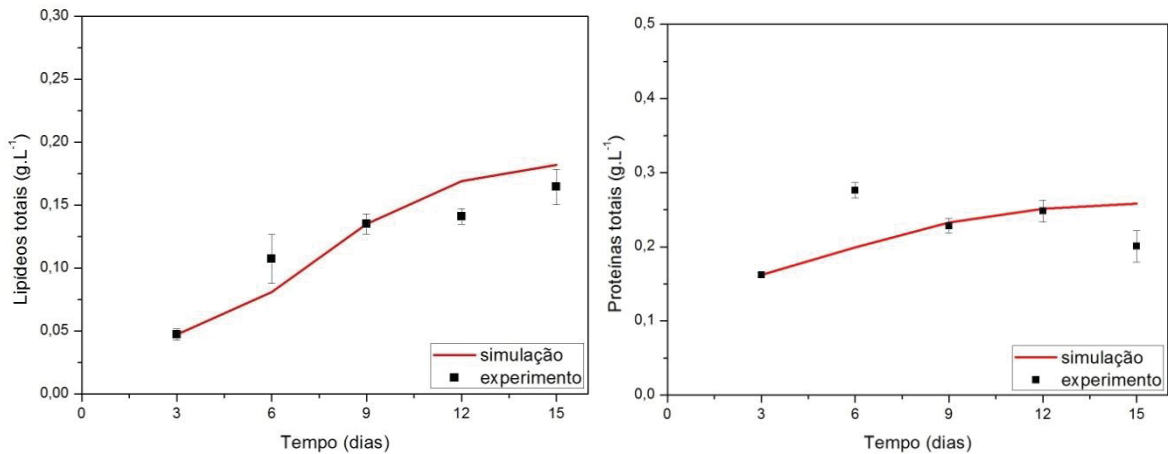
| Parâmetros | Valor | Unidade de medida | Parâmetros | Valor | Unidade de medida |
|---------------------|------------|-------------------|----------------------|------------|-------------------|
| μ_{foto} | 0,2145231 | dia ⁻¹ | K_{NH_3} | 1,7397741 | g.L ⁻¹ |
| K_{co_2} | 0,00000105 | g.L ⁻¹ | K_{la} | 2,00614127 | dia ⁻¹ |
| μ_{lip} | 0,11111838 | dia ⁻¹ | Y_x | 1,34598763 | g.g ⁻¹ |
| K_{lip} | 0,94058973 | g.L ⁻¹ | μ_{gli} | 1,90451476 | dia ⁻¹ |
| μ_{carb} | 0,249455 | dia ⁻¹ | K_{gli} | 0,00003801 | g.L ⁻¹ |
| K_{carb} | 1,31594337 | g.L ⁻¹ | $X_{\text{máxmix}}$ | 1,042192 | g.L ⁻¹ |
| μ_{prot} | 0,3912384 | dia ⁻¹ | X_{maxfoto} | 5,254531 | g.L ⁻¹ |
| K_{prot} | 0,00001405 | g.L ⁻¹ | | | |

FONTE: A autora (2019).

Os valores obtidos para cada parâmetro após a realização do ajuste possuem grandezas que apresentam significado físico. Este fato corrobora as hipóteses consideradas na realização do modelo matemático. Apesar da diferença entre os modelos matemáticos e conseqüentemente, das considerações atribuídas para cada parâmetro, realizando uma análise em relação à ordem de grandeza, os valores encontrados no presente trabalho são semelhantes aos realizados em condições mixotróficas na literatura (YANG et al., 2011; FIGUEROA-TORRES; PITTMAN; THEODOROPOULOS, 2017). Na Figura 20 é demonstrado o ajuste do modelo para os dados do cultivo em meio mixotrófico e como pode ser observado, as curvas se aproximam dos pontos experimentais com pequenas discrepâncias.

Figura 20 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS.

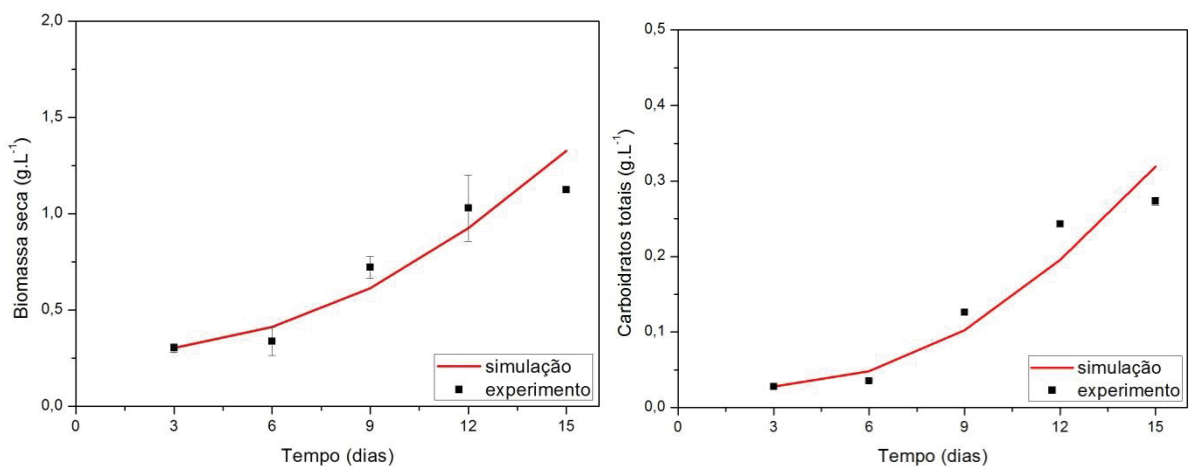


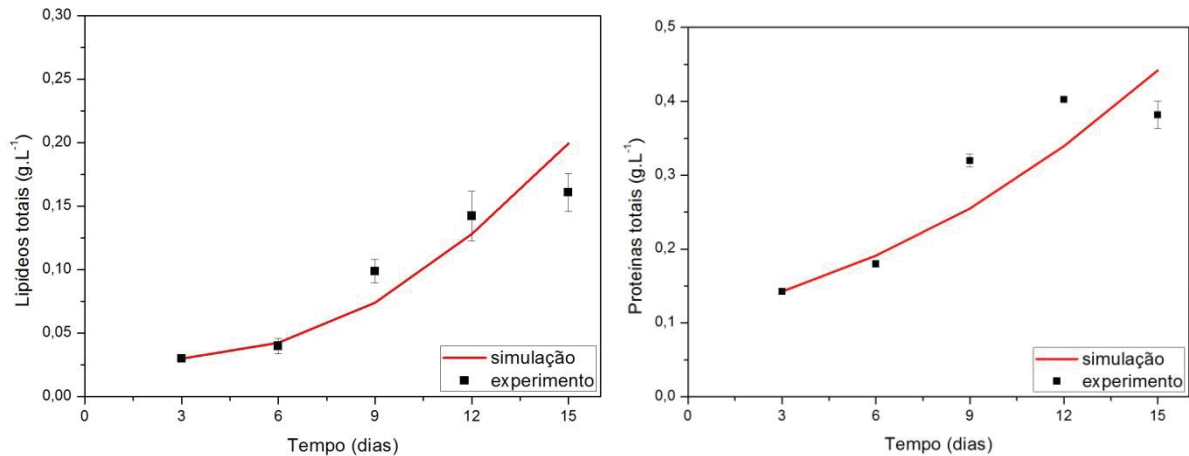


FONTE: A autora (2019).

Nos valores reais coletados, através da biomassa seca, é possível observar a tendência ao fim da fase exponencial no cultivo mixotrófico no dia 6, semelhante a curva teórica. O modelo também conseguiu ajustar de maneira satisfatória a tendência dos dados experimentais no acúmulo de carboidratos, lipídeos e proteínas, corroborando as hipóteses consideradas. Com relação à validação experimental, pode ser observado na Figura 21, a comparação do modelo matemático com os pontos correspondentes ao experimento do cultivo foto autotrófico. Para isso, foram utilizados os mesmos valores dos parâmetros obtidos da simulação do sistema em regime mixotrófico.

Figura 21 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS.





FONTE: A autora (2019).

Na validação experimental é perceptível que o modelo foi capaz de descrever o acúmulo de biomassa e das macromoléculas. Analisando o último ponto dos dados obtidos no experimento referentes a concentração de biomassa, apesar da tendência no comportamento da fase estacionária no cultivo, para corroborar este fato seria necessário a coleta de pontos além do período que este foi realizado. Portanto, a curva teórica é uma aproximação da realidade observada. De maneira geral, o aumento verificado nos lipídeos e carboidratos em algumas fases do cultivo mixotrófico em relação ao foto autotrófico, é decorrente da atuação do glicerol intracelular, que pode ser convertido para energia instantânea ou armazenado como reserva energética na forma de carboidratos e lipídios (PARANJAPE; LEITE; HALLENBECK, 2016).

Neste contexto, Yang et al. (2011), descrevem um acréscimo na biomassa do meio no cultivo mixotrófico com glicerol, diferentemente do fenômeno observado na presente pesquisa. Entretanto, é importante destacar que os autores utilizaram junto ao tri-álcool a caseína como fonte de nitrogênio, proporcionando o balanço mais equilibrado entre o C e N no meio, favorecendo o fornecimento de energia ao metabolismo e a divisão celular. Contudo, no experimento realizado neste trabalho, a concentração de nitrogênio foi mantida constante (de acordo com o meio sintético CHU) para o meio foto autotrófico e mixotrófico, pois, um dos gargalos que tornam insustentável a produção de microalgas em maior escala é a utilização deste elemento, devido à competição ocasionada com as culturas agrícolas (MARKOU; MONLAU, 2019), como descrito na fundamentação teórica.

No cultivo mixotrófico, o crescimento dos fungos pode ter sido favorecido devido à presença do glicerol, pois, a fonte de carbono orgânica contribui no desenvolvimento destes microrganismos que em alta concentração, interferem na produtividade da biomassa das microalgas (LAM et al., 2018). Contudo, considerando que a modelagem realizada é uma simplificação metabólica avaliando somente carboidratos, lipídeos e proteínas, os valores teóricos obtidos são coerentes, sendo importante destacar que existe a formação de outros componentes na célula (atualmente desconsiderados), que influenciam no peso final da biomassa.

6.3.2 Hipótese da formação do composto I: ajuste dos parâmetros

O ajuste dos parâmetros por otimização no modelo matemático que considera a hipótese da formação do composto I através do glicerol, foi realizado com o conjunto de dados do regime foto autotrófico e mixotrófico. Após ajuste dos parâmetros, estes foram utilizados na simulação com os dados do cultivo foto autotrófico, sendo possível descrever a tendência dos dados experimentais neste meio com exceção do comportamento observado nas proteínas totais, que apresentou discrepância na curva teórica em relação à experimental. Desta maneira, na Tabela 12 constam os valores encontrados no ajuste dos parâmetros realizado no MATLAB®.

Tabela 12 – VALORES DOS PARÂMETROS ENCONTRADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO.

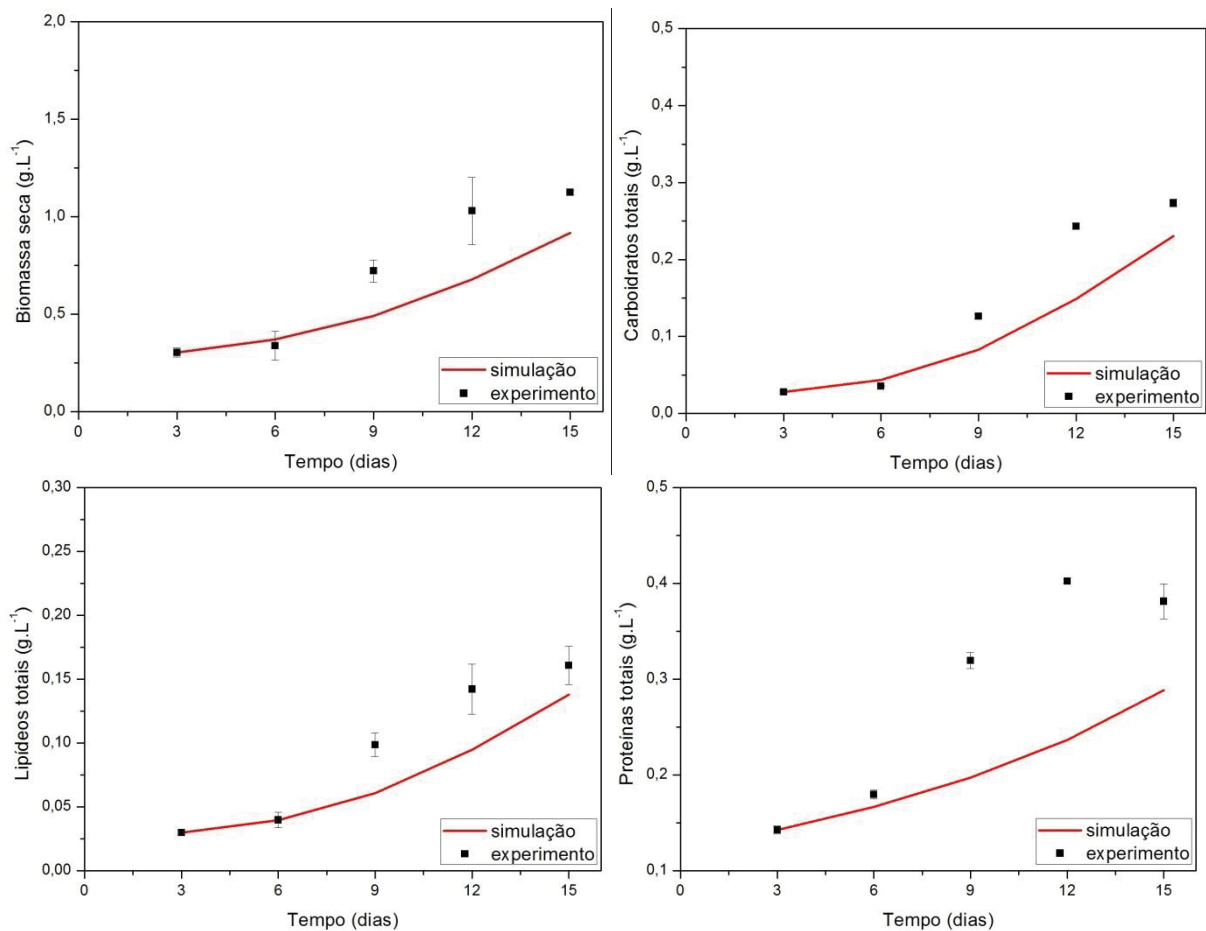
| Parâmetros | Valor | Unidade de medida | Parâmetros | Valor | Unidade de medida |
|---------------------|-------------|-------------------|--------------------|-------------|-------------------|
| μ_{foto} | 0,10518749 | dia ⁻¹ | Y_x | 1,34236249 | g.g ⁻¹ |
| K_{co2} | 0,00006971 | g.L ⁻¹ | μ_{gli} | 8,61047439 | dia ⁻¹ |
| μ_{lip} | 0,07332302 | dia ⁻¹ | K_{gli} | 3,11943867 | g.L ⁻¹ |
| K_{lip} | 0,33000044 | g.L ⁻¹ | K_{ig1} | 2,25643181 | g.L ⁻¹ |
| μ_{carb} | 3,51899504 | dia ⁻¹ | K_{ig2} | 0,10568548 | g.L ⁻¹ |
| K_{carb} | 11,05986291 | g.L ⁻¹ | K_{ig3} | 5,60624945 | g.L ⁻¹ |
| μ_{prot} | 0,00026980 | dia ⁻¹ | K_{ig4} | 2,33207824 | g.L ⁻¹ |
| K_{prot} | 0,00003308 | g.L ⁻¹ | K_{ig5} | 81,18628764 | g.L ⁻¹ |
| K_{NH3} | 17,82931766 | g.L ⁻¹ | μ_i | 2,90826571 | dia ⁻¹ |
| K_{la} | 11,98738703 | dia ⁻¹ | K_i | 9,65645018 | g.L ⁻¹ |

FONTE: A autora (2019).

É possível constatar nos parâmetros valores que apresentam uma significância física com exceção do K_{ig5} , demonstrando a limitação do modelo matemático e sendo interessante um valor mais coerente para este parâmetro. Na

Figura 22 se encontra o ajuste do modelo para os dados do cultivo em meio foto autotrófico e como pode ser observado, as curvas obedecem a tendência dos dados experimentais, descrevendo os fenômenos do acúmulo de biomassa, carboidratos e lipídeos no meio utilizado como controle. Contudo, com relação à concentração de proteínas, a curva teórica não segue o comportamento dos valores obtidos no experimento, possivelmente devido ao valor elevado encontrado no parâmetro K_{ig5} , que corresponde à constante de inibição da síntese de proteínas pelo composto I, ou seja, os dados da simulação indicam a continuação do acúmulo de proteínas, sendo incoerentes com a realidade do experimento que no intervalo entre os dias 12 e 15 apresenta uma estabilidade na produção. Além disso, o ajuste da fase exponencial na curva teórica de biomassa com relação aos dados reais não foi verificado.

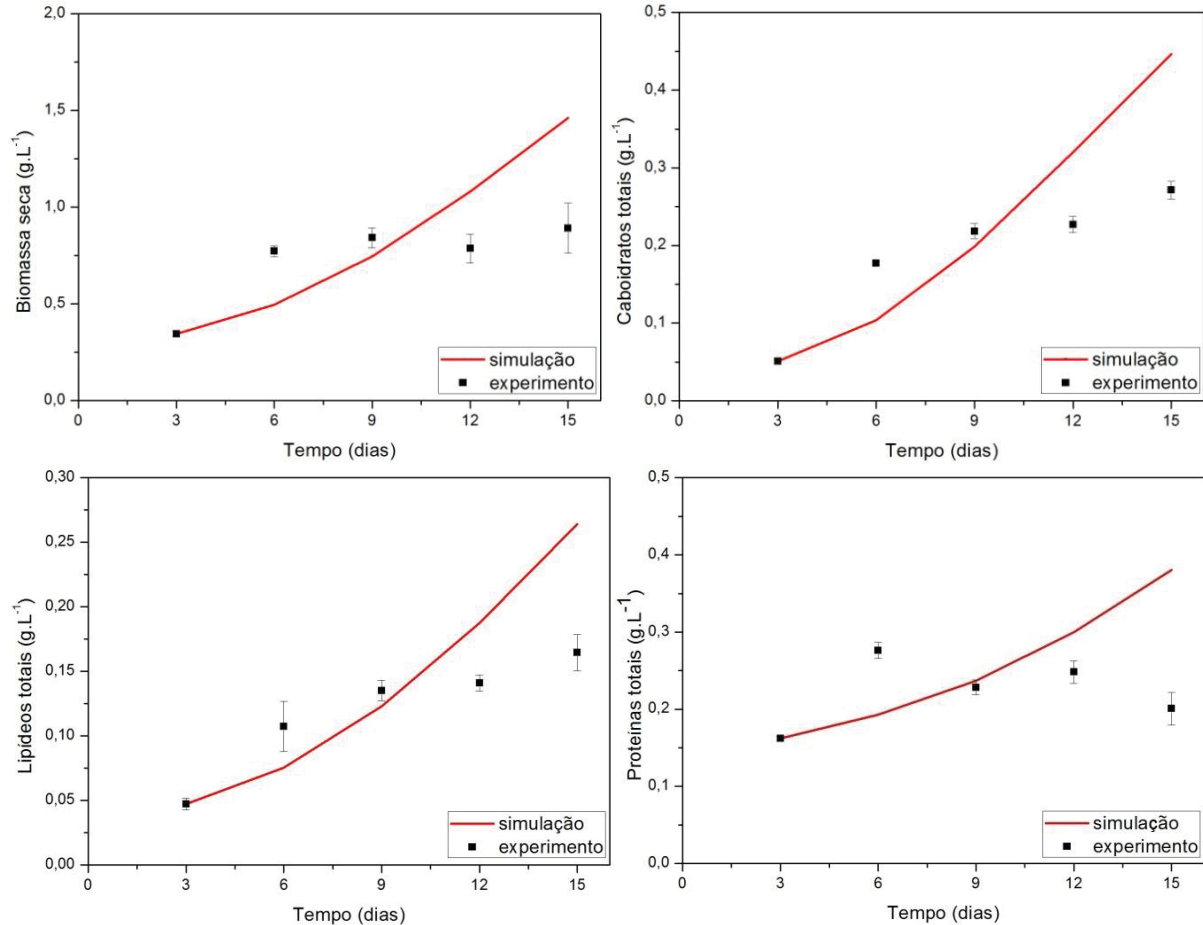
Figura 22 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO FOTO AUTOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS.



FONTE: A autora (2019).

Após, os parâmetros ajustados inicialmente utilizando o cultivo foto autotrófico e mixotrófico, foram simulados empregando o conjunto dos dados do meio com adição de glicerol. As curvas teóricas podem ser observadas na Figura 23, permitindo a comparação do modelo matemático com os pontos coletados referentes à concentração de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas totais. Através da simulação, é perceptível que o modelo não foi capaz de descrever com precisão os dados experimentais. Nos valores reais coletados, é verificado na concentração da biomassa o fim da fase exponencial aproximado no dia 6, enquanto a curva teórica apresentou um aumento exponencial até o 15º dia aproximadamente. Uma das hipóteses para explicação do fenômeno é a presença da contaminação fúngica (LAM et al., 2018) e assim, fatores incluindo a influência destes microrganismos no cultivo das microalgas necessitam ser considerados em modelos matemáticos futuros para melhor explicação dos dados experimentais.

Figura 23 – COMPARAÇÃO ENTRE A SIMULAÇÃO NUMÉRICA E OS DADOS EXPERIMENTAIS COLETADOS NO CULTIVO MIXOTRÓFICO: CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS.



FONTE: A autora (2019).

O modelo realizado é uma simplificação metabólica e inclui somente carboidratos, lipídeos e proteínas totais, sendo os valores teóricos observados incoerentes com a realidade. Contudo, é importante destacar que existe a formação de outros componentes na célula que foram desconsiderados e influenciam no peso final da biomassa. A não representação da curva teórica do modelo com a hipótese da formação do composto de inibição pelo glicerol, empregando os dados obtidos no experimento, demonstram a limitação das hipóteses utilizadas.

6.4 DISCUSSÃO SOBRE OS MODELOS MATEMÁTICOS

O modelo matemático do fator logístico melhor apresentou a tendência dos dados experimentais. Enquanto o modelo da hipótese de inibição descreve satisfatoriamente o acúmulo de biomassa, carboidratos e lipídeos no meio foto autotrófico, não é adequado para indicar o comportamento do cultivo mixotrófico. O modelo logístico demonstrou o comportamento do acúmulo da biomassa e dos metabólitos em regime foto autotrófico e mixotrófico, entretanto, foi necessário o ajuste de $X_{\text{máx}}$ diferenciado para o conjunto de dados dos diferentes cultivos, reduzindo a generalidade do modelo. Considerando a complexidade do acúmulo de biomassa e das macromoléculas através do metabolismo central, o modelo da hipótese logística desenvolvido e validado utilizando os dados experimentais, pode auxiliar na redução do tempo de produção do cultivo, pois, no desenvolvimento das tecnologias relacionadas as microalgas um dos maiores desafios é o alto custo de produção (SUN et al., 2018).

Em relação às possíveis extensões, é interessante a utilização de outras espécies e fontes de carbono orgânico oriundas dos subprodutos de processos industriais, agregando maior sustentabilidade a cadeia e podendo substituir parcialmente ou totalmente compostos inorgânicos de origem não renovável ou que competem com o setor de alimentos e assim, avaliar o aumento da produtividade da biomassa e das macromoléculas nas microalgas. Neste contexto, a interferência da luz e da temperatura poderiam ser implementadas como variáveis no modelo preditivo. Outra possibilidade de extensão do modelo é considerar a inibição causada pela presença dos fungos que possivelmente reduziram a produtividade da

biomassa, pois, o desenvolvimento destes é propiciado no meio de cultivo quando existe a presença da fonte de carbono orgânica como o glicerol (LAM et al., 2018).

A partir do modelo matemático logístico, é possível estimar o acúmulo de biomassa e macromoléculas na microalga, auxiliando nos cultivos destes microrganismos, pois, além da destinação para elaboração de produtos de alto valor agregado na indústria de cosmético e fármacos, a produção de etanol de terceira geração considera inúmeros fatores que são caracterizados pelo emprego de matrizes renováveis que gerem poucos impactos ao meio ambiente, alto rendimento no produto obtido e baixos custos de produção (JAMBO et al., 2016), na qual, a biomassa residual das microalgas pós delipidação, pode ser utilizada como substrato na fermentação alcoólica (CHNG; CHAN; LEE, 2016, SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018).

7 CONCLUSÃO

A partir dos objetivos propostos no trabalho, a presente pesquisa realizou a coleta dos dados experimentais no laboratório cultivando a microalga em regime foto autotrófico e mixotrófico com adição de glicerol, quantificando o teor de carboidratos, lipídeos e proteínas totais. Além disso, os modelos matemáticos foram elaborados e ajustados com os valores experimentais no software MATLAB®, sendo somente o modelo da hipótese logística validado. De acordo com os resultados constatados é possível concluir:

- O comportamento experimental do cultivo realizado com a microalga *Tetrademus obliquus* em condição foto autotrófica e mixotrófica demonstrou diferença na concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas, dependendo do intervalo de tempo analisado. Contudo, os resultados apresentam um menor acúmulo de biomassa no meio com adição de glicerol, podendo ser justificado pela constituição de outros metabólitos com menor peso molecular. Uma segunda hipótese é a inibição pela contaminação fúngica constatada, contudo, esta não foi avaliada, sendo sugestão para trabalhos futuros. Ainda, a menor divisão celular pode ser decorrente da não suplementação de nitrato no meio e assim, apesar da alta disponibilidade da fonte de carbono orgânica, houve um desequilíbrio da razão entre C:N, sendo o último nutriente essencial para a divisão celular.

- O modelo matemático logístico elaborado utilizando a equação de Monod foi capaz de demonstrar o acúmulo de biomassa, carboidratos, lipídeos e proteínas na microalga *Tetradismus obliquus* cultivada nas condições descritas. A simulação logística utilizando os valores para obtenção dos parâmetros e ajuste do modelo foi realizada em baixo tempo computacional, assim como a validação experimental. As curvas teóricas da simulação seguiram a tendência dos valores reais, demonstrando a coerência da modelagem com o sistema. Apesar da complexidade da constituição da biomassa, foi possível descrever o comportamento das fases exponencial e início da estacionária para o regime mixotrófico. Como discutido durante o trabalho, os demais componentes das microalgas foram desconsiderados para simplificação, influenciando no peso total da célula e desta maneira, o modelo é adequado para previsões gerais.

- O modelo matemático proposto através da hipótese da formação do composto I foi incapaz de demonstrar com precisão o comportamento do acúmulo da biomassa e das macromoléculas em regime mixotrófico. Desta forma, o modelo logístico apresentou a melhor descrição dos dados experimentais.

8 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

A partir da realização do presente trabalho, inúmeros direcionamentos podem ser considerados para prosseguimento da pesquisa, sendo importante destacar a necessidade do estudo do acúmulo dos metabólitos de interesse nas microalgas, para a substituição parcial ou total de fontes não renováveis ou insustentáveis na produção de energia e alimentos. Desta maneira, é destacado os seguintes aspectos:

- 1) Cultivo da microalga *Tetradismus obliquus* em meio mixotrófico com glicerol utilizando diferentes concentrações de nitrogênio para definição das melhores condições experimentais do crescimento e acúmulo dos metabólitos de interesse;

- 2) Mensurar a concentração de nitrogênio do meio, buscando monitorar a capacidade de absorção deste nutriente pela microalga no decorrer do tempo em cultivo mixotrófico com glicerol. Desta maneira, será possível verificar a relação destes dois fatores na formação da biomassa.

3) Utilização do modelo matemático elaborado para outras espécies de microalgas cultivadas sob diferentes condições, empregando fontes de carbono alternativas ao glicerol. Além disso, incluir no modelo matemático a hipótese da inibição da biomassa e das macromoléculas causada pela contaminação dos fungos no meio de cultivo.

4) Análise do perfil de carboidratos e lipídeos formados em cada fase do crescimento da microalga *Tetrademus obliquus* (como também, outras espécies), possibilitando compreender a rota metabólica do glicerol absorvido e se o armazenamento deste acontece na forma estrutural ou reserva.

5) Realizar a extração de lipídeos da biomassa cultivada com adição de glicerol na pesquisa e posterior destinação da biomassa residual para produção de etanol;

6) Variar as concentrações de glicerol do meio e verificar o consumo do tri-álcool para avaliar a eficiência da microalga no tratamento de efluentes.

9 REFERÊNCIAS

ABUD, Ana K. de Souza; SILVA, Carlos E. de Farias. Bioethanol in Brazil: Status, Challenges and Perspectives to Improve the Production. **Bioethanol Production From Food Crops**, [s.l.], p.417-443, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813766-6.00021-7>.

ADESANYA, Victoria O. et al. Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 157, p.293-304, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.032>.

ANDRULEVICIUTE, Vaida et al. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.83-90, 24 maio 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0048-x>.

Association of the Official Analytical Chemistry – AOAC. Official and tentative methods of analysis. Arlington, Virginia: AOAC International, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648: Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011.

ARAÚJO, Carlos Daniel Mandolesi de et al. Biodiesel production from used cooking oil: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 27, p.445-452, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.014>.

SOLOMON, Barry; BAILIS Robert. Brazil: biodiesel. In: Solomon B, Bailis R, editors. Sustainable Development of Biofuels in Latin America and the Caribbean. New York: Springer; 2014. p. 103–26.

BARBERA, Elena; SFORZA, Eleonora; KUMAR, Sandeep; MOROSINOTTO, Tomas; BERTUCCO, Alberto. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in liquid hydrolysate from flash hydrolysis for nutrient recycling. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 207, p. 59-66, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.103>.

BAROUKH, Caroline et al. A state of the art of metabolic networks of unicellular microalgae and cyanobacteria for biofuel production. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 30, p.49-60, jul. 2015a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.019>.

BAROUKH, Caroline et al. Mathematical modeling of unicellular microalgae and cyanobacteria metabolism for biofuel production. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 33, p.198-205, jun. 2015b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.002>.

BERTOFT, Eric. Understanding Starch Structure: Recent Progress. **Agronomy**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.1-29, 25 ago. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy7030056>.

BIBI, Riaz et al. Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 71, p.976-985, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.126>.

BRASIL. Seção 1.,11 de maior de 1983. Publicada no Diário Oficial da União em 11 de maior de 1983.

BRASIL. Lei Nº 13.263, 23 de março, 2016. Publicado no Diário Oficial da União em 23 de março de 2016.

BRASIL. Resolução Nº 16, 29 de outubro de 2018. Publicado no Diário Oficial da União em 8 de novembro de 2018.

CAMIRO-VARGAS, Tania K. et al. Dissolved inorganic carbon uptake by *Rhodomonas* sp. and *Isochrysis aff. galbana* determined by a potentiometric technique. **Aquacultural Engineering**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.83-95, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.10.001>

CARNEY, Laura T.; LANE, Todd W.. Parasites in algae mass culture. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 5, 6 jun. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00278>.

CHENG, Yun; LU, Yue; GAO, Chunfang; WU, Qingyu. Alga-Based Biodiesel Production and Optimization Using Sugar Cane as the Feedstock. **Energy & Fuels**, [s.l.], v. 23, n. 8, p. 4166-4173, 20 ago. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ef9003818>.

CHNG, Lee Muei; CHAN, Derek J.c.; LEE, Keat Teong. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 130, p.68-73, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.02.016>.

CHOI, Hee-jeong; YU, Sung-whan. Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.506-513, 6 mar. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1013988>.

CORTEZ, Luís A. B. et al. 0 Years of the Brazilian Ethanol Program (Proálcool): Relevant Public Policies and Events Throughout Its Trajectory and Future Perspectives. **The 22nd International Symposium on Alcohol Fuels – 22 nd ISAF**, [s.i], p.1-13, 2016.

DALENA, Francesco et al. Ethanol From Biomass. **Ethanol**, [s.l.], p.25-59, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811458-2.00002-x>.

DANESH, Azadeh Fazeli et al. Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 125, p.56-64, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.017>.

DARDA, Sophia; PAPALAS, Theodoros; ZABANIOTOU, Anastasia. Biofuels journey in Europe: Currently the way to low carbon economy sustainability is still a challenge. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 208, p.575-588, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.147>.

DUBOIS, Michel. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.350-356, mar. 1956. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>.

ENAMALA, ManojKumar et al. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 94, p.49-68, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>.

FANG, Ying-ru; YEH, Yun; LIU, Hwai-shen. A novel strategy of biodiesel production from wet microalgae by direct saponification–esterification conversion (DSEC). **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 83, p.23-31, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2017.12.001>.

FERNANDES, Tomásia et al. Marine microalgae growth and carbon partitioning as a function of nutrient availability. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 214, p.541-547, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.001>.

FIGUEROA-TORRES, Gonzalo M.; PITTMAN, Jon K.; THEODOROPOULOS, Constantinos. Kinetic modelling of starch and lipid formation during mixotrophic, nutrient-limited microalgal growth. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 241, p.868-878, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.177>.

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G.H.. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226, 497–509, 1957.

FOTT, Bohuslav. Phlyctidium scenedesmi spec. nova, a new chytrid destroying mass cultures of algae. **Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.97-102, 1967. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.3630070203>.

GUEST, Jeremy S. et al. Lumped Pathway Metabolic Model of Organic Carbon Accumulation and Mobilization by the Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 47, n. 7, p.3258-3267, 15 mar. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es304980y>.

HASSAN, Shady S.; WILLIAMS, Gwilym A.; JAISWAL, Amit K.. Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: Drivers, challenges, and opportunities. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 101, p.590-599, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.11.041>.

HE, Yongjin et al. Analysis and model delineation of marine microalgae growth and lipid accumulation in flat-plate photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 111, p.108-116, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.014>

HOSSEINI, Nekoo Seyed et al. Microalgae cultivation in a novel top-lit gas-lift open bioreactor. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 192, p.432-440, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.092>.

IASIMONE, F. et al. Effect of light intensity and nutrients supply on microalgae cultivated in urban wastewater: Biomass production, lipids accumulation and settleability characteristics. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 223, p.1078-1085, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.024>.

ILKOV, G. Population dynamic relationships during *Phlyctidium scenedesmi* development in *Scenedesmus acutus* cultures. **Appl. Microbiol.** v. 6, p. 104–110. 1975.

JAMBO, Siti Azmah et al. A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 65, p.756-769, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>.

KATIIYAR, Richa et al. Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 113, p.1359-1365, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.100>.

KLOK, Anne J. et al. A model for customising biomass composition in continuous microalgae production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 146, p.89-100, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.039>.

KONG, Wei-Bao et al. Effects of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Food Technol. Biotechnol.** V. 5, n. 1, p. 62–69, 2013.

KUMAR, B. Ramesh et al. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 17, p.583-588, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.017>.

LAM, Tan Phat et al. Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 252, p.180-187, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.088>.

LAURENS, Lieve M.I.; CHEN-GLASSER, Melodie; MCMILLAN, James D.. A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. **Algal Research**, [s.l.], v. 24, p.261-264, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.002>.

LEHMUSKERO, Anni; CHAUTON, Matilde Skogen; BOSTRÖM, Tobias. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. **Progress In Oceanography**, [s.l.], v. 168, p.43-56, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>.

LEITE, Gustavo B. et al. Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 184, p.123-130, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.117>.

LIAO, Qiang et al. Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 250, p.583-590, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.086>.

LIN, Tse-shih; WU, Jane-yii. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured undermixotrophic condition. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 184, p.100-107, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.005>.

MAIRET, Francis et al. Modelling microalgae growth in nitrogen limited photobioreactor for estimating biomass, carbohydrate and neutral lipid productivities. **Ifac Proceedings Volumes**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.10591-10596, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3182/20110828-6-it-1002.03165>.

MARKOU, Giorgos; MONLAU, Florian. Chapter 6 – Nutrient recycling for sustainable production of algal biofuels. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00006-8>

MATHIMANI, Thangavel et al. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 208, p.1053-1064, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.096>.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.371-394, out. 1949. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.

MORAIS, Etiele Greque de et al. Glycerol increases growth, protein production and alters the fatty acids profile of *Spirulina (Arthrospira)* sp LEB 18. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 76, p.40-45, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.024>.

MYKLESTAD, Sverre; HAUG, Arne. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.125-136, jan. 1972. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(72\)90041-x](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(72)90041-x).

NADZIR, Syafiqah Md et al. Optimisation of carbohydrate, lipid and biomass productivity in *Tetrademus obliquus* using response surface methodology. **Biofuels**,

[s.l.], p.1-10, 19 jan. 2019. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/17597269.2018.1542568>.

OLIVEIRA, Fernando C. de; COELHO, Suani T.. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 75, p.168-179, ago. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.060>.

PALIWAL, Chetan et al. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 244, p.1216-1226, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>.

PANCHA, Imran et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 156, p.146-154, mar. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>.

PANDEY, Ashok et al. Recent Advances in Thermochemical Conversion of Biomass. S.l: Elsevier, 2015. 504 p.

PANDIYAN, K. et al. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 132, p.723-741, mar. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.049>.

PARANJAPE, Kiran; LEITE, Gustavo B.; HALLENBECK, Patrick C.. Strain variation in microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 204, p.80-88, mar. 2016. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.071>.

PATEL, Anil Kumar et al. Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 282, p.245-253, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.024>.

PATNAIK, Reeza; MALLICK, Nirupama. Utilization of *Scenedesmus obliquus* biomass as feedstock for biodiesel and other industrially important co-products: An integrated paradigm for microalgal biorefinery. **Algal Research**, [s.l.], v. 12, p.328-336, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.009>.

PODDAR, Nature; SEN, Ramkrishna; MARTIN, Gregory J.o.. Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth. **Algal Research**, [s.l.], v. 33, p.298-309, jul. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.002>.

QIU, Renhe et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, [s.l.], v. 28, p.192-199, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>.

REN, Hongyan et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a pilot-scale photobioreactor using real centrate wastewater with waste glycerol for improving microalgae biomass production and wastewater nutrients removal. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 245, p.1130-1138, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.040>.

RIZZA, Lara Sanchez et al. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, [s.l.], v. 22, p.140-147, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.021>.

REN21. Renewables 2018 Global Status Report. (Paris: REN21 Secretariat). ISBN 978-3-9818911-3-3. 2018.

RYU, Kyung Hwan et al. A mathematical model of intracellular behavior of microalgae for predicting growth and intracellular components syntheses under nutrient-replete and -deplete conditions. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 115, n. 10, p.2441-2455, 25 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26744>.

SAJJADI, Baharak et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 97, p.200-232, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C.. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal Of Energy Research**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.291-311, 4 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/er.1695>.

SAYEDA, Abdo M.; ALI, Gamila H; EL-BAZ , Farouk K. Potential production of omega fatty acids from microalgae. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res**, p. 210-215. 2015.

SENGMEE, Dennapaet al. Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.1970-1976, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.10.089>.

SHOW, Pau Loke et al. A Holistic Approach to Managing Microalgae for Biofuel Applications. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.215-249, 22 jan. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18010215>.

SHUNNI, Zhu et al. Effect of nitrogen starvation cultivation on carbohydrate and lipid accumulation in *Chlorella* sp. **Acta Energetica Solaris Sinica**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.2118-2122, ago. 2016.

SINGH, Kawarpal; KUMAR, Sharoff Pon; BLÜMICH, Bernhard. Monitoring the mechanism and kinetics of a transesterification reaction for the biodiesel production with low field 1H NMR spectroscopy. **Fuel**, [s.l.], v. 243, p.192-201, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2019.01.084>.

SIVARAMAKRISHNAN, Ramachandran; INCHAROENSAKDI, Aran. Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel. **Fuel**, [s.l.], v. 217, p.458-466, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.12.119>.

SKORUPSKAITE, Virginija; MAKAREVICIENE, Violeta; LEVISAUSKAS, Donatas. Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp. for biofuel production using response surface methodology. **Algal Research**, [s.l.], v. 7, p.45-50, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.001>.

SUN, Han et al. High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-23, 20 ago. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-018-1225-6>.

SUNDARRAJAN, Panneerselvam et al. A review on cleaner production of biofuel feedstock from integrated CO₂ sequestration and wastewater treatment system. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 210, p.445-458, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.010>.

TEMPLETON, David W.; LAURENS, LieveM.I.. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. **Algal Research**, [s.l.], v. 11, p.359-367, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.013>.

TAHER, Dhyogo Miléo. Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

THOAI, Dang Nguyen et al. Evaluation of Biodiesel Production Process by the Determining of the Total Glycerol Content in Biodiesel. **Energy Procedia**, [s.l.], v. 138, p.544-551, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.157>.

TSOULARIS, A.; WALLACE, J.. Analysis of logistic growth models. **Mathematical Biosciences**, [s.l.], v. 179, n. 1, p.21-55, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-5564\(02\)00096-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-5564(02)00096-2).

VARGAS, José Viriato Coelho; ARAKI, Luciano Kiyoshi. **Cálculo numérico aplicado**. Barueri - Sp: Manole, 2017.

VELJKOVIĆ, Vlada B. et al. Biodiesel production from corn oil: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 91, p.531-548, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.024>.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 71, p.475-501, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>.

ZHAN, Jiao; RONG, Junfeng; WANG, Qiang. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 42, n. 12, p.8505-8517, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021>.

ZHAN, Jingjing; HONG, Yu; HU, Hongying. Effects of Nitrogen Sources and C/N Ratios on the Lipid-Producing Potential of *Chlorella* sp. HQ. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 1290-1302, 28 jul. 2016. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1512.12074>.

ZHOU, X.; BROADBELT, L.j.; VINU, R.. Mechanistic Understanding of Thermochemical Conversion of Polymers and Lignocellulosic Biomass. **Thermochemical Process Engineering**, [s.l.], p.95-198, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ache.2016.09.002>.

ZHU, Fan. Relationships between amylopectin internal molecular structure and physicochemical properties of starch. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 78, p.234-242, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.024>.

ZHUANG, Lin-lan et al. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 94, p.1110-1119, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.06.006>.

YANG, Jinshui et al. Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3077-3082, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.049>.

YOO, Sung Jin; KIM, Jung Hun; LEE, Jong Min. Dynamic modelling of mixotrophic microalgal photobioreactor systems with time-varying yield coefficient for the lipid consumption. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 162, p.228-235, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.128>.

YUAN, Hao et al. Analyzing the effect of pH on microalgae adhesion by identifying the dominant interaction between cell and surface. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 177, p.479-486, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.023>.