



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

MESTRADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

ROSANA MACHADO GALVÃO

MODELAGEM DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA
Haematococcus pluvialis



SALVADOR
2011

ROSANA MACHADO GALVÃO

MODELAGEM DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA
Haematococcus pluvialis

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Industrial.

Orientadores: Prof. Dr. Emerson Andrade Sales
Prof. Dr. Cristiano Hora de Oliveira Fontes

Salvador
2011

G182 Galvão, Rosana Machado

Modelagem da produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis* / Rosana Machado Galvão. – Salvador, 2011.

77 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andrade Sales

Prof. Dr. Cristiano Hora de Oliveira Fontes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Escola Politécnica, 2011.

1. Biomassa. 2. Alga. Modelagem de dados. I. Sales, Emerson Andrade. II. Fontes, Cristiano Hora de Oliveira. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDD: 660.6

**“MODELAGEM DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA HAEMATOCOCCUS
PLUVIALIS”**

ROSANA MACHADO GALVÃO

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Prof. Emerson Andrade Sales Emerson Andrade Sales
Doutor em Ciências / Engenharia Química pela Université Paris VII – Denis Diderot (1996);

Prof. Cristiano Hora de Oliveira Fontes Cristiano Hora de Oliveira Fontes
Doutor em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2001);

Prof. Luciano Matos Queiroz Luciano Matos Queiroz
Doutor em Engenharia Civil - Hidráulica pela Universidade de São Paulo, Brasil (2009);

Prof^a. Rosenira Serpa da Cruz Rosenira Serpa da Cruz
Doutora em Química pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2001).

Salvador, BA - BRASIL
Outubro/2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida e por permitir tudo possível.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã, pelo amor e apoio nesta trajetória. Em especial meu pai, Tarcilo Galvão, pelo incentivo e companheirismo.

Aos meus orientadores, Emerson Sales e Cristiano Fontes, pela oportunidade, confiança e por me auxiliarem no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelos valiosos ensinamentos e por contribuírem de forma significativa para minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Bionergia e Catálise. Em especial a Cíntia Almeida, Tarlen Santana e Louise Lins, por todos os ensinamentos e ajuda na parte experimental do trabalho. Agradeço também a Orlando Jorquera, pelas suas contribuições na condução do trabalho.

Aos colegas do Programa de Engenharia Industrial, por todo apoio e amizade.

À equipe do Teclim – Rede de Tecnologias Limpas da Bahia.

À equipe do Laboratório de Geotecnia.

Aos professores que de alguma forma contribuíram com críticas e sugestões a este trabalho: Karla Esquerre, Elaine Albuquerque, Luciano Queiroz e Asher Kiperstok.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Agradeço aos amigos que mesmo não ligados a este trabalho foram grandes incentivadores.

“De nada valem as idéias sem homens que
possam pô-las em prática.”

Karl Marx

GALVÃO, Rosana Machado. Modelagem da produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis*. 77 f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RESUMO

O uso de microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis tem sido apontado, por muitos pesquisadores, como essencial para reduzir as emissões dos gases que provocam o efeito estufa, visto que o cultivo de microalgas pode atuar no processo de sequestro de CO₂ e a biomassa formada pode ser utilizada na substituição de combustíveis fósseis. Dessa forma, o interesse pela otimização do cultivo de microalga não está somente na fonte de produtos de alto valor agregado, mas na formação de um novo coproduto, o biocombustível. Neste trabalho, foi avaliado o crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* nas condições de luminosidade que variaram de 2000 a 10000 lux, temperatura 22 °C e valores de pH entre 6,5 a 12,5. Os experimentos foram realizados em um reator tipo placas planas com um volume de 4 litros e o meio de cultura utilizado foi o Meio Rudic. O crescimento da biomassa foi medido pelo método de contagem em câmara de Neubauer e por métodos espectrofotométricos. Observou-se que a intensidade de luz e o pH do meio influenciam a taxa de crescimento desta microalga. Foi possível representar a produção da biomassa por um modelo com comportamento exponencial, no qual os parâmetros foram ajustados de forma a descrever o crescimento da microalga ao longo do tempo. Também foi proposto e avaliado um modelo autorregressivo não-linear, baseado em Redes Neurais Artificiais, para a predição de comportamento dinâmico do pH durante o crescimento da microalga em diferentes intensidades luminosas. Simulações foram realizadas a fim de analisar o comportamento da produção de biomassa e prever o desempenho do processo para outras intensidades de luz dentro do intervalo estudado. Ainda foi avaliado o comportamento do crescimento da microalga em experimentos com controle de pH pela adição de CO₂ no meio de cultivo.

Palavras-chave: Biomassa microalgal. *Haematococcus pluvialis*. Modelagem.

GALVÃO, Rosana Machado. Modeling of biomass production of *Haematococcus pluvialis*. 77 f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

ABSTRACT

The use of microalgae for production of biofuels has been pointed by many researchers as essential to reduce the emissions of gases that cause global warming. Microalgae cultivation can act in the process of CO₂ sequestration and the biomass formed can be used to replace fossil fuels. Thus, the interest in optimization of the microalgae cultivation is not only in high added value products but also in the formation of biofuels. This work presents a study the growth of microalgae *Haematococcus pluvialis* considering light conditions from 2000 to 10000 lux, temperature 22 °C and pH in the range 6,5 - 12,5. The experiments were performed on a flat plate reactor with a volume of 4 liters and the culture medium used was Rudic medium. The biomass growth was measured by the method of counting in a Neubauer chamber and by spectrophotometric methods. It was observed that the light intensity and the pH of the medium influence the rate of growth of microalgae. The production of biomass was represented for a model with exponential behavior, where the parameters were adjusted to describe the growth of microalgae over time. It was also proposed and evaluated a nonlinear autoregressive model based on Artificial Neural Networks for the prediction of dynamic behavior of the pH during the growth of microalgae in different light intensities. Simulations were carried out to analyze the behavior of biomass production and predict the process performance other light intensities within the range studied. In addition, the behavior of the growth of microalgae was evaluated in experiments with pH control by addition of CO₂ in the culture medium

Key Words: Biomass of microalgae. *Haematococcus pluvialis*. Modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Processo de captura de CO ₂ em fotobiorreatores, utilizando microalga para converter CO ₂ e energia solar em biomassa microalgal. (Fonte: Adaptado de SKJANES <i>et al.</i> , 2007).....	22
Figura 2.2 - Taxa específica de crescimento para <i>Phaeodactylum tricorutum</i> em diferentes irradiâncias para cultivos aerados e não aerados. (Fonte: Adaptado de PÉREZ <i>et al.</i> , 2008).....	28
Figura 2.3 - Efeito da intensidade de luz versus taxa de crescimento específica de microalgas. (Fonte: Adaptado de CHISTI, 2007).....	29
Figura 2.4 - Produção de Spirulina em raceway (Earthrise Nutraceuticals, LLC, California); b) Produção de Haematococcus pluvialis em raceway (Parry Nutraceuticals, Tamil Nadu, India) (Fonte: BENEMANN, 2008).....	34
Figura 2.5 - Geometria de Fotobiorreatores (a) Plana. (b) Tubular. (c) Cilíndrica. (Fonte: GRIS, 2011).....	36
Figura 2.6 - Representação esquemática do crescimento de microalgas em um cultivo estanque, exibindo cinco fases distintas de crescimento. (Fonte: LOURENÇO, 2006)	37
Figura 2.7 – Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em cultivo semicontínuo, com as características de variações bruscas de densidade de células em decorrência das diluições dos cultivos. (Fonte: LOURENÇO, 2006).	39
Figura 2.8 - Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> (a) Célula em crescimento vegetativo e (b) Célula com acúmulo de carotenóides. (Fonte: LORENZ E CYSEWSKI, 2000).....	40
Figura 2.9 – Modelo do neurônio artificial.....	42
Figura 2.10 - Representação genérica de rede com N _h neurônios intermediárias e um neurônio na saída e p entradas.....	44
Figura 3.1 - Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	46
Figura 3.2 - Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> produzindo astaxantina.	46
Figura 3.3 - Sistema reacional: Reator Placa.....	48
Figura 4.1 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h) para intensidade de luz de 2000 lux.	53
Figura 4.2 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h) para intensidade de luz de 6000 lux.	54

Figura 4.3 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h) para intensidade de luz de 10000 lux.....	54
Figura 4.4 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h), para 3000, 4000 e 5000 lux.	56
Figura 4.5 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h), para 7000, 8000 e 9000 lux.	57
Figura 4.6 - Sistema proposto para RNA.	60
Figura 4.7 - Comportamento do pH para 2000 lux.	62
Figura 4.8 - Comportamento do pH para 6000 lux.	62
Figura 4.9 - Comportamento do pH para 10000 lux.	63
Figura 4.10 - Modelo do comportamento do pH para faixas de luz de 2000 a 1000 lux.	64
Figura 4.11 - Comportamento da produção de biomassa em função de tempo para intensidades de luz de 50 e 90 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	66
Figura A.1 – Valor do peso seco para intensidade luminosa de 2000 lux.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Comparação de algumas fontes de produção de biodiesel.	18
Tabela 2.1 – Comparação de teor de lipídeos em diferentes espécies de microalgas.	41
Tabela 3.1 – Composição dos Nutrientes para o meio de cultura RM.	47
Tabela 4.1 – Parâmetros do modelo de produção de biomassa.....	55
Tabela 4.2 – Taxa específica máxima de crescimento.	59
Tabela 4.3 – Valores estimados dos parâmetros da RNA para diferentes intensidades de luz.	61
Tabela B.1 – Resultados para intensidade luminosa de 2000 lux.	76
Tabela B.2 – Resultados para intensidade luminosa de 6000 lux.	77
Tabela B.3 – Resultados para intensidade luminosa de 10000 lux.	77

LISTA DE NOMENCLATURAS

Letras Latinas

A	Parâmetro	[células/mL]
B	Parâmetro	[h]
t_m	Tempo de resposta	[h]
W₁	Peso (parâmetro na rede neural)	
W₂	Peso (parâmetro na rede neural)	
W₃	Peso (parâmetro na rede neural)	
W₄	Peso (parâmetro na rede neural)	
b₁	Bias 1	
b₂	Bias 2	
b₃	Bias 3	

Letras Gregas

μ	Taxa específica de crescimento	[h ⁻¹]
μ_{max}	Taxa específica máxima de crescimento	[h ⁻¹]

Abreviações

OD	Densidade ótica
FBR	Fotobiorreator
RM	Meio Rudic
RNA	Rede Neural Artificial

Siglas

PEI	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial
LABEC	Laboratório de Bioenergia e Catálise
LAPO	Laboratório de Propriedades Óticas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Cinética de Crescimento de Microorganismos em Geral	24
2.2. Modelos de Cinética de Crescimento e de Produção de Biomassa de Microorganismos Fotossintetizantes.	26
2.3. Fatores que influenciam o Crescimento das Microalgas	32
2.4. Sistemas de Cultivo	33
2.5. Regimes de Cultivo de Microalgas.....	36
2.6. Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	39
2.7. Redes Neurais Artificiais.....	42
3. METODOLOGIA.....	45
3.1. Dados do Microorganismo	45
3.2. Meio de Cultura	47
3.3. Condições de Cultivo.....	48
3.4. Determinação da Biomassa.....	49
3.5. Planejamento Experimental	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Modelo Proposto para Produção de Biomassa em diferentes Intensidades Luminosas	52
4.2. Cinética de Crescimento do Microorganismo	58
4.3. Modelo Autorregressivo para Predição de Comportamento dinâmico de pH em diferentes Intensidades Luminosas.....	60
4.4. Experimentos com Controle de pH.....	64
5. CONCLUSÕES.....	67

5.1. Considerações Finais	67
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A	75
APÊNDICE B.....	76

1. INTRODUÇÃO

O uso de microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis tem sido apontado, por muitos pesquisadores, como essencial para reduzir as emissões dos gases que provocam o efeito estufa.

Atualmente, o biodiesel é produzido a partir de plantas oleaginosas como soja, girassol, canola, algodão, mamona, dendê, dentre outras fontes, tais como a gordura animal. Porém, um estudo apresentado por Crutzen e colaboradores (2008) mostrou que o N₂O proveniente da produção do agro-biocombustível pode anular o efeito benéfico do uso destes combustíveis na redução do aquecimento global, visto que a molécula de óxido nitroso, cuja emissão é acelerada no modo de produção usado pelo agro negócio, pode apresentar um agravamento no aquecimento global, visto que a mesma apresenta um efeito estufa com um potencial 296 vezes maior quando comparado com uma molécula do dióxido de carbono.

As microalgas são consideradas uma alternativa adequada para uma nova geração de biodiesel por apresentarem um alto conteúdo de óleo (AMIN, 2009; GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009). O biodiesel de microalgas é tecnicamente viável e no presente é apontado como um combustível renovável que apresenta o potencial de substituir completamente os combustíveis derivados de petróleo. Porém, muito deve ser feito para minimizar o uso de energia no processo, para que o mesmo seja viável em larga escala. A abordagem mais promissora é a produção diversificada, com foco em energia a partir da biomassa, mas tendo outros produtos químicos sendo produzidos em paralelo, numa concepção do tipo bio-refinaria.

Como as plantas, as microalgas usam luz solar para produzir óleo e ainda o fazem de forma mais eficiente que as plantas oleaginosas (CHISTI, 2007; GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009), como apresentado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Comparação de algumas fontes de produção de biodiesel.

Fonte	Rendimento de óleo (L/ha)
Milho	172
Soja	446
Canola	1.190
Jatropha (pinhão manso)	1.892
Côco	2.689
Palma	5.950
Microalga a	136.900
Microalga b	58.700

a: 70% de óleo (por peso) em biomassa

b: 30% de óleo (por peso) em biomassa

(Fonte: GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009)

O cultivo em massa de microalgas tem despertado interesse na área de bioenergia, mas já é praticado há muitos anos como fonte de produtos de química fina, alimentos e tratamento de efluentes. Atualmente, a fotossíntese das microalgas é considerada significativa para redução das emissões de dióxido de carbono (YUN e PARK, 2003). Estes microorganismos ainda podem fornecer algumas fontes diferentes de energia renovável, como o biodiesel; bio-hidrogênio produzido fotobiologicamente; e ainda, a biomassa residual, obtida após a extração do óleo, pode ser utilizada em digestores anaeróbios para produção de biogás, na pirólise para produção de bio-óleo, na gaseificação para produção de gás de síntese, etc.

As microalgas produzem corantes, ácidos graxos, polissacarídeos e vitaminas que são de grande interesse para indústrias farmacêuticas, de alimentos, têxteis, entre outras. Assim, o biodiesel de microalgas pode ser considerado um coproduto no contexto de produtos de alto valor agregado.

Com o aumento do interesse do cultivo em massa de microalgas, a modelagem cinética do crescimento tem se tornado importante, uma vez que um modelo adequado é necessário para projetar fotobiorreatores eficientes, prever o desempenho do processo e otimizar as condições de operação (YUN e PARK, 2003).

A biomassa microalgal deve ser produzida em grande quantidade e para isso deve utilizar fotobiorreatores de larga escala. Porém o *scale up* ainda é difícil devido aos investimentos necessários na área de bioengenharia. Chist (2008) citou que é necessária uma rigorosa avaliação econômica para estabelecer competitividade em relação aos combustíveis derivados de petróleo. Neste trabalho foi utilizado um reator tipo placa plana, que apresenta as seguintes características e potencialidades (UGWU *et al.*, 2008):

- Elevada área superficial de iluminação;
- É adequado para cultivos em ambientes externos;
- É relativamente barato, de fácil limpeza em relação aos fotobiorreatores com outras geometrias;
- Apresenta possibilidade de estresse para algumas cepas;

Os sistemas utilizados para cultivo em microalgas consistem em lagoas abertas ou fotobiorreatores fechados. Segundo Gris (2011), a viabilidade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas das microalgas utilizadas, bem como, pelas condições climáticas e pelos custos da terra e da água. O sistema aberto consiste basicamente de áreas com grande superfície de contato com o ar, sendo cobertos ou não. Embora apresentem menor produtividade, sistemas abertos ainda são preferidos em função dos menores custos de instalação e manutenção. Já os fotobiorreatores são sistemas fechados que podem apresentar diferentes geometrias como plana, tubular, espiral, serpentina, entre outros. Para a produção em massa, é preferível o uso de sistema fechado ao sistema aberto, assim como citado por Partil e colaboradores (2008). As lagoas abertas são economicamente mais favoráveis embora se deva considerar o custo de uso da terra, a disponibilidade de água e os problemas de contaminação por fungos, bactérias e protozoários. Já em fotobiorreatores (FBR) fechados é possível ter mais controle sobre o sistema.

Neste trabalho foi avaliada a produção de biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis*, que é uma microalga que além de possuir considerável concentração de lipídeos,

ainda produz o pigmento astaxantina, o qual, devido à sua coloração atrativa e funcionalidade biológica, é utilizado como suplemento alimentar, corante em alimentos e fonte de pigmento em aquicultura (GHIGGI, 2007). É citado também na literatura estudo sobre outras microalgas, por exemplo, o estudo de Solovchenko e colaboradores (2008) que mostrou que sobre a *Parietochloris incisa* que aumenta não só a produção de biomassa, mas também a produção do teor de ácido araquidônico, em condições de deficiência de nitrogênio.

O objetivo deste trabalho foi analisar experimentalmente, em escala de bancada, a produção de biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* e, em adicional, identificar modelos empíricos para descrever o comportamento de dois importantes parâmetros reacionais, quais sejam, a produção de biomassa e o pH. Para tal, foram realizados ensaios experimentais em regime de batelada a fim de analisar os principais parâmetros que influenciam no crescimento desta microalga, que são luminosidade e pH no meio cultura.

Optou-se, neste trabalho, por um fotobiorreator placa plana devido a sua elevada área superficial de iluminação, relativamente barato, de fácil limpeza e alta produtividade de biomassa. O regime de cultivo dos experimentos foi em batelada, por ser o meio mais usual e apresentar um menor custo de operação.

A formação da biomassa foi analisada por um modelo com comportamento exponencial, onde os parâmetros foram ajustados de forma a descrever o desempenho do crescimento da microalga ao longo do tempo, numa intensidade luminosa que variou de 2000 a 10000 lux. Para avaliação do pH foi proposto um modelo autorregressivo não-linear, baseado em Redes Neurais Artificiais, para a predição de comportamento dinâmico do pH durante o crescimento da microalga em diferentes intensidades luminosas.

Simulações foram realizadas a fim de predizer o comportamento da produção de biomassa para outras intensidades de luz. Dessa forma, espera-se responder qualitativamente qual a melhor condição de produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis* através de modelos matemáticos empíricos. Já que a partir da simulação é possível observar em qual irradiância pode ter maior produtividade de biomassa ou em qual ponto

ocorre maior retardo de crescimento devido a mudança metabólica da célula e tendência de produção de pigmentos.

Na literatura é comum encontrarmos modelos fenomenológicos para estudo da cinética de crescimento de microorganismos, porém neste trabalho foi proposto um modelo empírico para reprodução de células. A estrutura de modelo proposta para biomassa produzida ainda é pouco estudada na área de engenharia bioquímica.

A importância em fazer um modelo para representar o crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* é porque esta microalga apresenta um comportamento singular, no qual podem ocorrer alterações metabólicas em suas células e posterior mudança na cinética de crescimento de acordo com as condições de cultivo. Além disso, esse tipo de estudo poderia ser usado em trabalhos futuros para análises de outras microalgas que podem ter características ou comportamentos similares.

Neste trabalho, realizou-se também experimento em batelada com controle de pH pela adição de CO₂ no meio do cultivo a fim de avaliar o comportamento do crescimento da microalga em um meio onde não há variação significativa desta variável.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. Neste capítulo, foi apresentada uma introdução ao tema abordando a motivação, objetivos e justificativas para realização deste trabalho. O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica, na qual abordou os seguintes temas: cinética de crescimento de microorganismos em geral; cinética de crescimento de microalgas; características da microalga *Haematococcus pluvialis*; e finalmente, uma revisão sobre redes neurais artificiais. O capítulo 3 apresenta a metodologia usada para a realização dos experimentos e informações sobre os materiais e equipamentos utilizados. Os resultados e discussão são apresentados no capítulo 4. O capítulo 5 apresenta as conclusões do trabalho e sugestões para trabalhos futuros relacionados a este tema. Por fim, têm-se as referências bibliográficas e apêndices.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As microalgas apresentam diversas características de interesse, pois elas são usadas em diversas aplicações na aquicultura, possuem propriedades dietética e nutricional devido seus pigmentos (carotenos e proteínas), ácidos graxos poli-insaturados, e outros produtos de interesse farmacêutico. Algumas microalgas podem remover metais pesados de águas marinhas e efluentes industriais (PEREZ *et al.*, 2008). Atualmente as microalgas têm sido apontadas como uma fonte de produção sustentável de energia, visto que a sua produção de biodiesel pode ultrapassar a produção em plantas oleaginosas.

Skjanes e colaboradores (2007) estudaram também o uso de algas para captura de CO₂. A Figura 2.1 ilustra o processo de captura de CO₂ em fotobiorreatores (sistema fechado, de cultivo de microalgas).

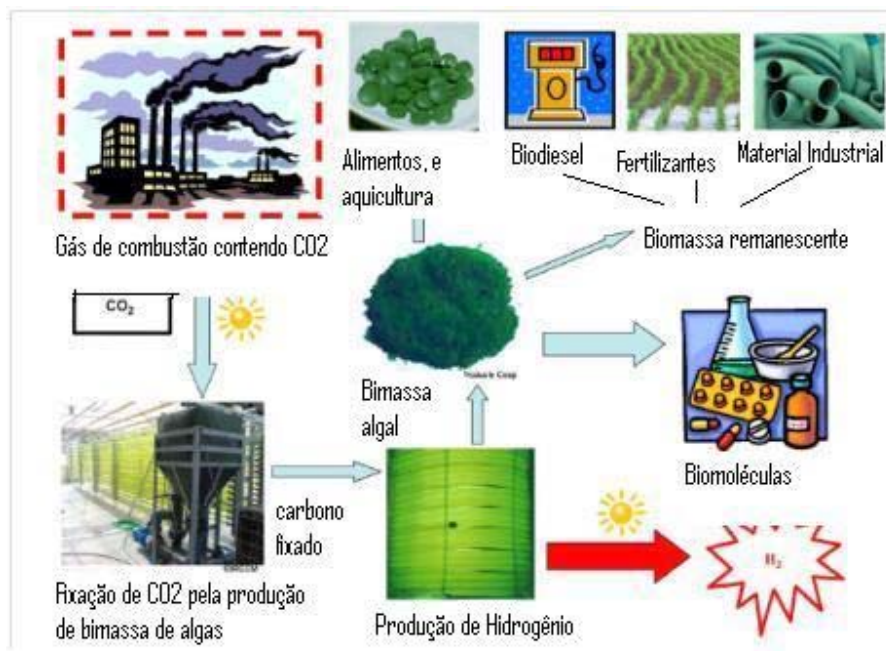


Figura 2.1 - Processo de captura de CO₂ em fotobiorreatores, utilizando microalga para converter CO₂ e energia solar em biomassa microalgal. (Fonte: Adaptado de SKJANES *et al.*, 2007)

Devido a esta diversidade de utilização de microalgas, o interesse no estudo sobre este tema tem se expandido cada vez mais, a fim de dominar técnicas de cultivos que se adéquem melhor a cada finalidade de uso deste microorganismo. Segundo Ohse e colaboradores (2007) e Gris (2011) pode se destacar as seguintes classes de microalgas:

- Diatomáceas (*Bacillariophyceae*): As células armazenam carbono, seja na forma de óleo natural ou de um polímero de carboidratos conhecido como crisolaminarina. Suas células são eucarióticas, sua forma de vida é unicelular cocóide, de colônias filamentosas e outras formas. Fazem parte de seu complexo coletor de luz clorofilas a, b e c, β -caroteno e xantofilas, conferindo-lhes uma coloração dourado-amarronzada.
- Algas verdes (*Chlorophyceae*): abundantes em água doce. Sua forma é unicelular ou formando colônias. Sua principal forma de reserva é o amido, porém sob certas condições podem armazenar óleo. Sua coloração é verde, devido aos pigmentos clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas. Sua parede celular geralmente é celulósica.
- Algas verde-azuladas (*Cyanophyceae*): as células são procarióticas, sendo muito semelhantes em estrutura e organização às bactérias. Sua forma de vida é unicelular, colonial e filamentosa. Apresentam como reserva o amido das cianofíceas, glicogênio e cianoficina. Sua coloração é verde-azulada, verde, violeta, vermelho e castanho, o que se deve à composição de pigmentos que possui: clorofila a, ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina, β -caroteno e xantofila. Estas algas apresentam papel muito importante na fixação do nitrogênio atmosférico. Aproximadamente 2.000 espécies são conhecidas e encontradas nos mais variados habitats.
- Algas douradas (*Chrysophyceae*): grupo similar às diatomáceas, principalmente pela pigmentação e composição bioquímica. Possuem um sistema de pigmentos mais complexo, podendo ser de coloração amarela, marrom ou laranja. Suas células são eucarióticas, sendo a maioria dos gêneros unicelulares

flagelados (monodal) ou coloniais; suas substâncias de reserva são constituídas de óleos naturais e crisolaminarina. Aproximadamente 1.000 espécies são conhecidas, principalmente em sistemas de água doce.

Existem inúmeras espécies de microalgas, algumas também ainda não identificadas. Dessa forma torna-se imperativo a ampliação de estudos para avaliar o crescimento destes microorganismos, visto que para ser viável o cultivo para comercialização da biomassa e coprodutos é necessário que se utilizem condições ótimas de produção.

2.1. Cinética de Crescimento de Microorganismos em Geral

A taxa de crescimento de microorganismos pode ser influenciada por alguns fenômenos que podem interferir no processo produtivo. Segundo Schimidell e colaboradores (2001), estes fenômenos podem ser limitações e inibições por substratos, principalmente no que se refere à existência e ao número de substratos limitantes e/ou inibidores, tipo de produto gerado, entre outros.

A Equação de Monod (Equação 2.1) descreve o crescimento de bactérias em função da concentração de um único substrato limitante.

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (2.1)$$

Onde μ_x (h^{-1}) é a velocidade específica de crescimento, μ_m (h^{-1}) é a velocidade máxima de crescimento (parâmetro cinético), K_s é a constante de meia saturação e S é a concentração de insumo limitante.

Schimidell *et al.* (2001) apresentaram alguns modelos cinéticos não estruturados (onde o material celular é representado por uma única variável, sem considerar variações de componentes intracelulares), descritos na literatura, para diversos fenômenos

identificados em processos fermentativos. Ele estudou equações de Moser (1958) e Cantois (1959) para taxa de crescimento de microrganismos em função de único substrato limitante. Megge *et al.* (1972), Tsao e Hanson (1975) e Dunn *et al.* (1992) estudaram o crescimento em função de múltiplos substratos limitantes. Andrews (1968) e Wu *et al.* (1988) avaliaram o crescimento de microrganismos num único substrato limitante e na presença de um inibidor. As equações de 2.2 a 2.7 apresentam estas correlações.

A) Crescimento num único substrato limitante:

$$\mu_x = \frac{\mu_m S^n}{K_s^n + S^n} \quad (2.2)$$

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s X + S} \quad (2.3)$$

B) Morte celular:

$$\mu_d = -K_d \quad (2.4)$$

C) Crescimento com um único substrato limitante e inibidor:

$$\mu_x = \frac{\mu_a S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.5)$$

$$\mu_x = \frac{\mu_a}{1 + \frac{K_s}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n} \quad (2.6)$$

D) Crescimento com múltiplos substratos limitante:

$$\mu_x = \frac{\mu_{m1} S_1}{K_{s1} + S_1} + \frac{\mu_{m2} S_2}{K_{s2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}} \quad (2.7)$$

Onde μ_x é a velocidade específica de crescimento (h^{-1}); μ_d é a velocidade específica de morte celular (h^{-1}); S , S_1 , S_2 são concentrações de substrato limitante; X é a concentração celular; μ_m , K_s , n , K_d , μ_a , μ_{m1} , μ_{m2} , K_{S1} e K_{S2} são parâmetros cinéticos.

Ainda podem ser descritas equações para o consumo do substrato limitante para manutenção, produção do produto metabólico associado e não associado ao crescimento e produção de produto metabólico inibitório.

Em resumo, percebe-se que existem diversos fatores que podem influenciar a taxa de crescimento dos microorganismos em geral. Na próxima seção serão avaliados estudos específicos para o crescimento de microalgas, que são microorganismos que podem apresentar características singulares já que são fotossintéticos.

2.2. Modelos de Cinética de Crescimento e de Produção de Biomassa de Microorganismos Fotossintetizantes.

Diferentemente dos microorganismos em geral, as microalgas e cianobactérias podem apresentar características particulares devido a sua característica fotossintética atuando também na biomitigação de CO_2 . O cultivo de microalgas pode ser classificado quanto ao seu metabolismo como: autotrófico, que utiliza a luz como fonte única de energia; heterotrófica: utiliza compostos orgânicos dissolvidos como fonte de carbono e energia; e mixotrófico: realiza fotossíntese como fonte de energia, embora compostos orgânicos e CO_2 sejam ambos essenciais. Nesta seção serão apresentados modelos específicos para crescimento de microalgas e cianobactérias que já tem sido usado em trabalhos que considera as peculiaridades deste microorganismo.

Pérez *et al.* (2008) desenvolveram estudos em batelada para desenvolver um modelo cinético para estudar a taxa específica de crescimento da *Phaeodactylum tricornutum*. Para este estudo os fatores avaliados foram pH, temperatura e irradiância. As Equações 2.8 a 2.10 apresentam o efeito destes parâmetros para o microorganismo citado.

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{1 + \left(\frac{[H^+]}{K_1}\right) + \left(\frac{K_2}{[H^+]}\right)} \quad (2.8)$$

μ é a taxa ou velocidade específica de crescimento (h^{-1}), μ_{\max} é a velocidade máxima de crescimento de crescimento (h^{-1}), $[H^+]$ corresponde a concentração de prótons ($mol\ L^{-1}$) e K_1 e K_2 são constantes cinéticas ($mol.L^{-1}$).

$$\mu = A.\exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) - B.\exp\left(-\frac{E_b}{RT}\right) \quad (2.9)$$

μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1}), E_a e E_b correspondem à energia de ativação do crescimento e da degradação celular ($mol.L^{-1}$), R é a constante universal dos gases ($kcal.mol^{-1}$), T é a temperatura (K), e A e B são fatores de frequência (h^{-1}).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{I + K_I} \quad (2.10)$$

Onde μ (h^{-1}) é a taxa específica de crescimento, I é a média da irradiância (μmol de fótons $m^{-2} s^{-1}$), e μ_{\max} (h^{-1}) e K_I (μmol de fótons $m^{-2} s^{-1}$) são parâmetros da equação de Monod. A Figura 2.2 apresenta a taxa específica de crescimento para cultivos aerados e não aerados em diferentes irradiância.

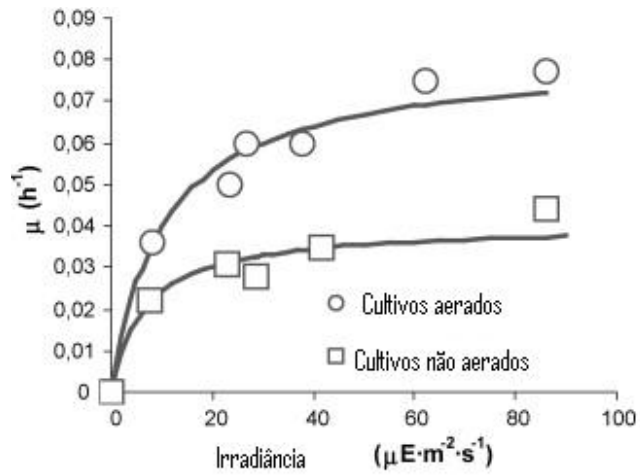


Figura 2.2 - Taxa específica de crescimento para *Phaeodactylum tricornutum* em diferentes irradiâncias para cultivos aerados e não aerados. (Fonte: Adaptado de PÉREZ *et al.*, 2008)

A Figura 2.3 mostra uma curva da taxa específica de crescimento em função da intensidade de luz, onde apresenta um ponto de saturação máxima da intensidade em que a taxa de crescimento é máxima, μ_{max} . Como apresentado por Chisti (2007), acima de certo valor de intensidade de luz ocorre uma redução na taxa de crescimento, este fenômeno é denominado fotoinibição. O ponto de inibição varia com condições do sistema de cultivo, e o tipo de microalga.



Figura 2.3 - Efeito da intensidade de luz versus taxa de crescimento específica de microalgas.

(Fonte: Adaptado de CHISTI, 2007)

Carlozzi e Pinzani (2005) avaliaram o crescimento de *Arthrospira* em um reator fechado do tipo bobina e com a incorporação de um manto para controle de temperatura. Concluiu-se que o sistema *airlift* é bastante adequado para o reciclo de cultura e que deve ser feito um estudo sobre a injeção de CO₂ para melhor aproveitamento deste gás.

Merchuk e Wu (2003) estudaram a modelagem de fotobiorreatores aplicando uma simulação de um reator do tipo *bubble column*. Neste trabalho os autores relacionam alguns trabalhos que consideram a distribuição de luz dentro do volume do reator, o fenômeno de fotoinibição e o efeito positivo da alternância de luminosidade.

Quinn e colaboradores (2011) estudaram sobre um modelo de crescimento em massa de microalgas com aplicações para escala industriais. Neste trabalho foi apresentando uma modelagem da taxa específica de crescimento como uma função da taxa fotossintética, taxa de respiração, e taxa específica de produção de nitrogênio.

$$\frac{1}{cC,X} \cdot \frac{dcC,X}{dt} = \mu = P_c - rR_c - \varepsilon \cdot rN \quad (2.11)$$

Onde, cC_X (g.L^{-1}) é o conteúdo de carbono da biomassa no reator, μ (h^{-1}) é a taxa específica de crescimento do carbono, P_c (h^{-1}) é a taxa fotossintética, rR_c (h^{-1}) é a taxa de respiração, ε (g.g^{-1}) eficiência biossintética, rN (h^{-1}) é taxa específica de absorção de nitrogênio.

Segundo Fleck-Schneider e colaboradores (2007) o modelo matemático do cultivo em fotobiorreator requer conhecimento entre o metabolismo do microrganismo, o fenômeno físico de transferência de luz dentro da suspensão e da fluidodinâmica do reator. A soma de todas as taxas dos produtos metabólicos intracelular é definida pela taxa específica de crescimento μ .

Yun e Park (2003) estudaram a modelagem cinética da atividade fotossintética de dependência da luz da microalga *Chlorella vulgaris*. Em quatro equações utilizadas existiam parâmetros relacionados com a luz que foram determinados em experimentos separados previamente. A taxa de respiração foi determinada por medida da taxa de consumo de oxigênio. A atividade fotossintética máxima e a constante de meia vida foram determinadas utilizando o algoritmo de regressão não linear de Marquardt-Levenberg.

Yokota e colaboradores (1994) propuseram uma nova relação entre a taxa de crescimento específico e a taxa de absorção específica de energia luminosa, verificando dados experimentais para cultura de *Chlorella ellipsoidea* assim como dados publicados para culturas de *Spirulina sp.* e *Oscillatoria agardhii*. Um actinômetro foi usado para medir a intensidade luminosa e a análise dos parâmetros do modelo proposto foi feita. Dos três parâmetros, apenas um depende da intensidade luminosa e os resultados obtidos mostraram uma correspondência satisfatória com os valores medidos. Neste trabalho foi proposto um novo modelo para a cinética de crescimento de microalgas, como apresentado pelas Equação 2.12 e 2.13.

$$\mu = k(\varepsilon - a)^{1/n} \quad (2.12)$$

$$k = \alpha e^{(-\beta I_0)} \quad (2.13)$$

Onde μ (h^{-1}) é taxa específica de crescimento, ε ($\text{kJ g}^{-1} \text{h}^{-1}$) é a taxa específica de absorção de luz, I_0 ($\text{kJ cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) é a intensidade de luz incidente, n é constante, a ($\text{kJ g}^{-1} \text{h}^{-1}$) é o coeficiente de manutenção, α ($\text{kJ}^{-1/n} \text{g}^{1/n} \text{h}^{(1/n-1)}$) e β ($\text{kJ}^{-1} \text{cm}^2 \text{h}$) são coeficientes.

A produção de biomassa da *Spirulina platensis* foi modelada por Çelekli e colaboradores (2009) utilizando o modelo não linear de Gompertz (Equação 2.14). A modificação deste modelo não só descreve o comportamento sigmoidal do crescimento de crescimento, como também revela a predição e otimização da produção de biomassa sob diferentes condições ambientais.

$$Biomassa = A \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{\mu \cdot \exp(1)}{A} \right) \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2.14)$$

Onde o valor da *Biomassa* é dado em g L^{-1} é μ (h^{-1}) é taxa específica de crescimento, λ (h) é o tempo correspondente a fase lag, A é concentração máxima de biomassa (g L^{-1}) e t (h) é o tempo.

Outros modelos também foram propostos para descrever o crescimento e alguns bioprodutos de microalgas, como foi citado por Rangel-Yagui e colaboradores (2004) e por Chojnacka e Noworyta (2004). A Equação 2.15 é uma modificação da Equação 2.14, proposta por Çelekli e colaboradores (2008) que representa uma análise de regressão não linear onde considera tanto o tempo de cultivo como a concentração de fosfato no meio de cultivo.

$$Biomassa = (a + b \cdot C) \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{(c+b \cdot C) \cdot \exp(1)}{(a+b \cdot C)} \right) \cdot ((e + f \cdot C) - t) + 1 \right] \right\} \quad (2.15)$$

Onde valor da *Biomassa* é dado g L^{-1} ; C é a concentração (fosfato ou nitrato); a, b, c, d, e, f são constantes; e, t (h) é o tempo.

Neste trabalho foi estudado um modelo exponencial para modelar a produção de biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis*, em diferentes intensidades de luz, já que diferentemente de muitos microorganismos, as microalgas são seres que realizam fotossíntese, dessa forma, a intensidade de luz no meio pode interferir na sua taxa de crescimento. Além da influência da luminosidade, podem existir também outros fatores que

podem interferir no crescimento das microalgas, como por exemplo: temperatura, pH do meio de cultura, fluxo de aeração no meio, taxa fotossintética, concentração de nutrientes no meio, entre outros.

2.3. Fatores que influenciam o Crescimento das Microalgas

A produção de biomassa e a taxa de crescimento das microalgas podem ser influenciadas por diversos fatores. Além disso, a condição em que a microalga é submetida pode causar uma alteração metabólica das células.

Os seguintes fatores podem ser citados por afetarem a taxa fotossintética, a produtividade em biomassa das microalgas e a atividade do metabolismo celular:

- Intensidade luminosa;
- pH;
- Composição do meio de cultivo;
- Temperatura;
- Geometria do sistema de cultivo;
- Regime de cultivo.

A fotossíntese representa um processo único de conversão de energia solar e componentes inorgânicos em matéria orgânica, dentro dos limites de capacidade de cada micro-organismo. A atividade fotossintética pode ser monitorada por meio de medidas de produção de oxigênio e relacionada à intensidade luminosa, gerando as chamadas curvas luz-resposta, onde são determinadas a irradiação de saturação e a taxa máxima de fotossíntese. Em baixas irradiâncias, essa taxa cresce linearmente com a intensidade luminosa, mas à medida que essa variável aumenta a fotossíntese torna-se cada vez menos eficiente, até atingir um platô, onde as reações enzimáticas que utilizam energia tornam-se

limitantes. Em condições prolongadas de irradiância acima do ótimo, geralmente a taxa de fotossíntese decresce, fenômeno conhecido como fotoinibição (GRIS, 2011).

No caso a microalga *Haematococcus pluvialis*, encontra-se na literatura que as condições ótimas requeridas para produção das células verdes são temperatura moderada (20-28 °C), baixo nível de radiação (30-140 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$), alta concentração de nitrato e fosfato (20 e 1 mM, respectivamente), pH entre 6.0-7.0 e adição de acetato (0.25% p/v) como fonte de energia adicional (GHIGGI, 2007; BOUSSIBA et al., 2000). A produção de células verdes limita o processo de produção de astaxantina uma vez que este pigmento é acumulado no interior dos cistos tornando-se importante a otimização da fase de crescimento vegetativo da *Haematococcus pluvialis* para alcançar-se bom rendimentos de astaxantina (GHIGGI, 2007).

2.4. Sistemas de Cultivo

Existem diferentes sistemas de cultivo para produção de biomassa de microalgas que vem sendo testados em escala de laboratório e industrial (JORQUERA *et al.*, 2010; UGWU *et al.*, 2008).

O sistema aberto consiste basicamente de áreas com grande superfície de contato com o ar, sendo cobertos ou não. Embora apresentem menor produtividade, sistemas abertos ainda são preferidos em função dos menores custos de instalação e manutenção (GRIS, 2011).

Embora a forma mais simples de cultivar microalgas seja a utilização de lagoas naturais com características apropriadas, os sistemas que mais se destacam são as lagoas do tipo *raceway*, construídas como tanques de “volta infinita”, onde a cultura é circulada por meio de pás giratórias; sistemas inclinados, onde a mistura é atingida por bombeamento e pela força da gravidade; lagoas circulares, onde a agitação é provida por um braço rotatório; e tanques com profundidade de mais de 30 centímetros (GRIS, 2011; TREDICI, 2004). A Figura 2.4 apresenta exemplos destes sistemas de cultivo.

Segundo Ugwu (2007) e colaboradores, uma das vantagens de utilizar lagoas abertas é que são mais fáceis de construir e operar do que os sistemas fechados. No entanto, existe uma deficiência de utilização da luz pelas células, e requerem grandes áreas de terra. Além disso, existe um maior risco de ocorrer contaminação de predadores já que as condições de cultivo são controladas. Ainda existe uma baixa produtividade de biomassa devido à baixa taxa de transferência de massa.



Figura 2.4 - Produção de Spirulina em raceway (Earthrise Nutraceuticals, LLC, California);
b) Produção de Haematococcus pluvialis em raceway (Parry Nutraceuticals, Tamil Nadu, Índia) (Fonte: BENEMANN, 2008)

Os sistemas fechados de cultivo de microalgas são representados por fotobiorreatores que podem assumir diferentes geometrias como plana, tubular, espiral, serpentina, entre outros. Neste tipo de sistema é possível controlar algumas variáveis do meio, como temperatura, fluxo de aeração, tipo de iluminação (solar, artificiais, ou ambas). A Figura 2.5 apresenta algumas configurações para fotobiorreatores.

As principais vantagens do uso de fotobiorreatores citados por Gris (2011) são: menores perdas de água por evaporação; redução dos problemas de contaminação por outros micro-organismos; maior facilidade na colheita de biomassa, que se concentra em menores volumes de cultura; controle maior das trocas gasosas entre o cultivo e o ar

atmosférico ou gás de combustão; menor ocupação de espaço; maior rendimento por unidade de área e volume; possibilidade de obter cultivos com alto grau de pureza, dentre outros.

As limitações do uso de fotobiorreatores citadas por Mata et. al.(2010), Ugwu (2008) e Gris (2011) são:

- No tipo tubular podem ocorrer acúmulo e crescimento de biomassa nas paredes; requer área grande; ocorrem gradientes de pH, O₂ dissolvido e CO₂ ao longo dos tubos;
- No tipo placas planas, o aumento de escala requer muitos compartimentos e materiais de suporte; stress hidrodinâmico; pode ocorrer acúmulo nas paredes.
- No tipo de colunas verticais predomina pequena área de superfície iluminada, o que se agrava com o aumento de escala; caro comparado a sistemas abertos; construção requer materiais sofisticados; stress por cisalhamento.

Neste trabalho optou-se por um fotobiorreator placa plana devido a sua elevada área superficial de iluminação, relativamente barato, de fácil limpeza e alta produtividade de biomassa.

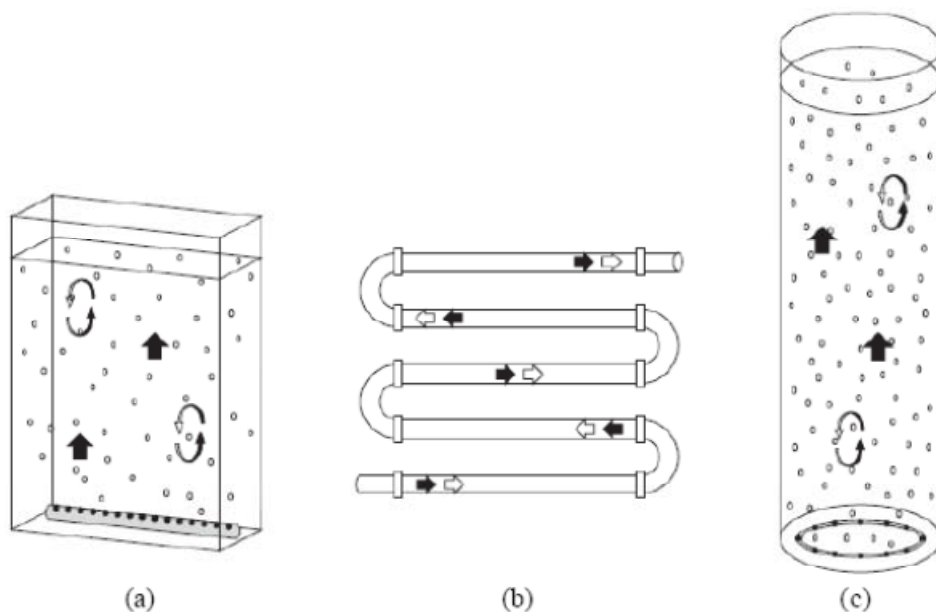


Figura 2.5 - Geometria de Fotobiorreatores (a) Plana. (b) Tubular. (c) Cilíndrica. (Fonte: GRIS, 2011).

2.5. Regimes de Cultivo de Microalgas

Os regimes de cultivos de microalgas que se destacam são em batelada, contínuos e semi-contínuos.

No cultivo em batelada ou estanque, as células são inoculadas no meio de cultura fresco e nenhum outro componente é adicionado ao longo do desenvolvimento do cultivo. O frasco de cultivo pode ser amostrado e seu conteúdo pode ser totalmente removido em determinado momento ou, ainda, ser parcialmente retirado e aproveitado, mas o volume removido não é substituído por um novo meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

O cultivo em batelada de microorganismos é caracterizado por etapas definidas. A Figura 2.6 apresenta a curva de produção de biomassa em função de tempo, caracterizado pelas seguintes etapas (LOURENÇO, 2006; GRIS, 2011):

- (1) fase de adaptação ou lag: que ocorre devido à presença de células inviáveis ou esporos no inóculo ou devido ao período de adaptação fisiológica das células

frente às modificações nas condições de cultivo, mas pode ser evitada quando células em crescimento exponencial avançado são usadas como inóculo;

- (2) fase exponencial ou logarítmica: onde inicia o crescimento e a multiplicação e as células se dividem como uma função exponencial do tempo, enquanto substratos, luz e temperatura adequada estiverem disponíveis;
- (3) fase de redução do crescimento ou de transição: marcada pelo decréscimo relativo da taxa de crescimento, pela redução dos nutrientes dissolvidos e, geralmente, pelo aumento dos efeitos do autosombreamento quando se trata de culturas densas;
- (4) fase estacionária: nesta fase o cultivo atinge o rendimento final máximo; a taxa de crescimento tende a torna-se estável e é sempre baixa;
- (5) fase de declínio ou de morte: é marcada pela morte e lise de muitas células; a taxa de crescimento é negativa.

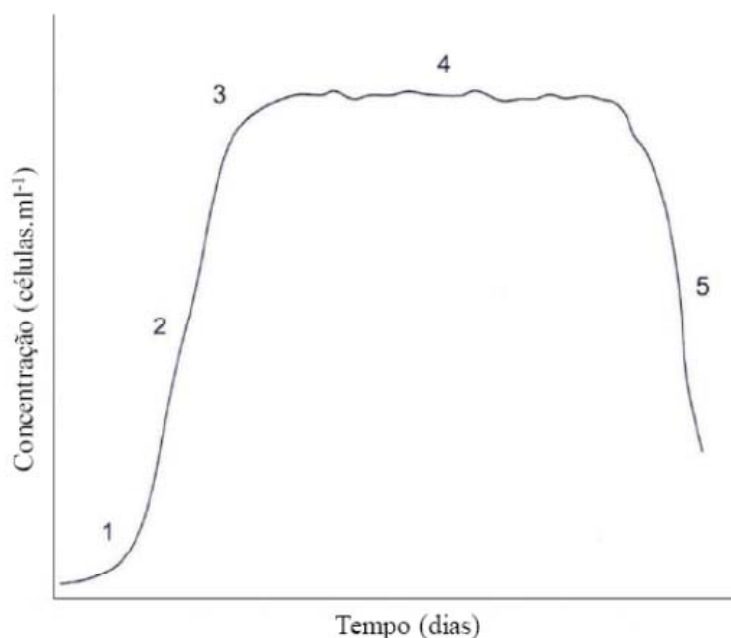


Figura 2.6 - Representação esquemática do crescimento de microalgas em um cultivo estanco, exibindo cinco fases distintas de crescimento. (Fonte: LOURENÇO, 2006)

Os cultivos em batelada podem ser utilizados para diversas finalidades, como para manutenção de cepas em laboratório até aplicações comerciais.

Os cultivos contínuos são caracterizados por um processo permanente de saída de cultura com microalgas e entrada de meio esterilizado no recipiente de cultivo, baseado em dois diferentes sistemas, turbidostato e quimiostato. Nesse último, a taxa de adição de meio e remoção de cultura são iguais e constantes, sendo o sistema utilizado quando deseja ajuste da fisiologia das células às condições de cultura existentes e da manutenção das taxas de crescimento específico em valores pré-determinados. No turbidostato, a concentração de células da cultura é mantida constante através do controle da vazão de meio. Este mecanismo é útil quando há instabilidade no cultivo e/ou não é possível manter a concentração de células em valores constantes num simples quimiostato (GRIS, 2011; LOURENÇO, 2006).

O cultivo contínuo é importante em empreendimentos comerciais para determinar a concentração ótima dos nutrientes por unidade de tempo em relação à taxa de diluição ou à colheita do cultivo, a fim de evitar desperdício de recursos (LOURENÇO, 2006).

Os cultivos semicontínuos são caracterizados por apresentarem uma grande produção de células por intervalo de tempo. Neste tipo de cultivo ocorre a substituição de parte do meio de cultivo em intervalos periódicos, geralmente quando a quantidade de biomassa presente já é alta. As curvas de crescimento típicas apresentam variações bruscas na densidade de células. Nesse tipo de cultivo a produtividade é elevada, bem como o consumo de nutrientes. A concepção atual de que microalgas constituem sistemas de alta produtividade advém em parte de cultivos semicontínuos. Embora os cultivos contínuos e semicontínuos forneçam microalgas com maior uniformidade do que em outros tipos de cultivo, podem ser necessários dias ou até semanas para estabilizar esse regime de cultivo. (GRIS, 2011; LOURENÇO, 2006). A Figura 2.7 a curva de crescimento semicontínuo, caracterizado pelas variações bruscas de densidade de células.

Neste trabalho utilizou-se o regime de cultivo em batelada, por ser o meio mais usual e apresentar um menor custo de operação.

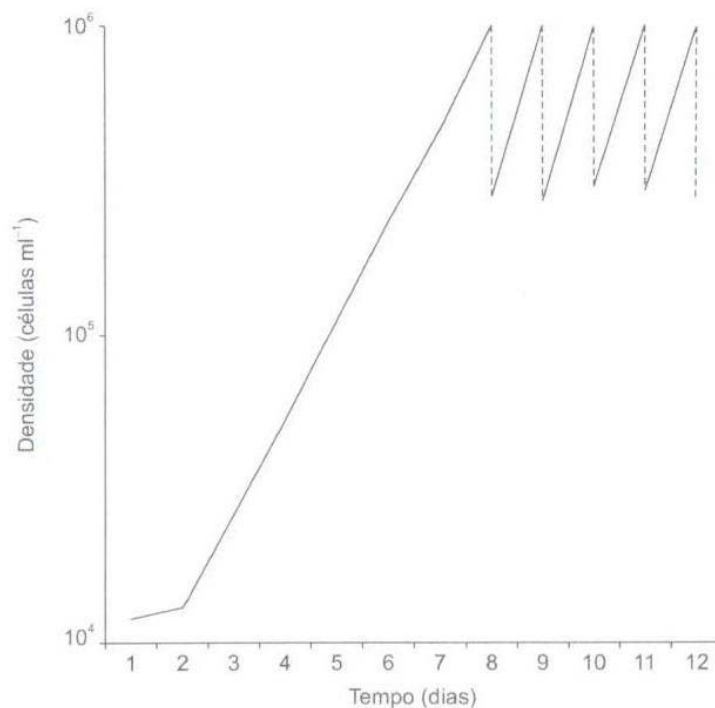


Figura 2.7 – Representação esquemática do desenvolvimento de microalgas em cultivo semicontínuo, com as características de variações bruscas de densidade de células em decorrência das diluições dos cultivos. (Fonte: LOURENÇO, 2006).

2.6. Microalga *Haematococcus pluvialis*

A microalga *Haematococcus pluvialis* tem se tornado de grande interesse, não só pelo seu conteúdo celular como nas demais microalgas, mas também, devido a sua capacidade de produzir astaxantina. Segundo Issarapayup e colaboradores (2009), este pigmento possui uma atividade antioxidante superior a outros carotenóides, pois apresenta um grande potencial anticancerígeno, e pode ser utilizado como pigmento na alimentação de viveiro de peixes e como aditivo alimentar na indústria alimentícia.

Existem mais de 10 mil espécies de microalgas reconhecidas, porém poucas são cultivadas comercialmente. Tem-se aumentado o interesse pela microalga *Haematococcus*

pluvialis, que possui um elevado poder carotenogênico, como uma fonte promissora para produção de astaxantina (GHIGGI, 2007; LORENZ E CYSEWSKI, 2000).

A *Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde (*Chlorophyta*), móvel, unicelular, fotossintética e capaz de sintetizar e acumular o pigmento astaxantina em resposta às condições ambientais (GHIGGI, 2007; DONG e ZHAO, 2004). Em geral, a composição da microalga *Haematococcus pluvialis* consiste em carotenoides, ácidos graxos, proteínas carboidratos e minerais (IMAMOGLU *et al.*, 2009;) A Figura 2.8 apresenta a diferença da *Haematococcus pluvialis* em crescimento vegetativo (predominância de clorofila a e b) e células encistadas (predominância de acúmulo de carotenóides).

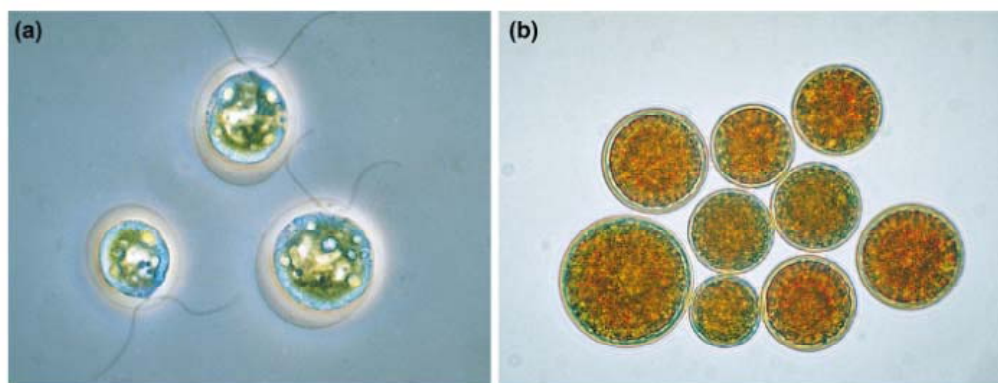


Figura 2.8 - Microalga *Haematococcus pluvialis* (a) Célula em crescimento vegetativo e (b) Célula com acúmulo de carotenóides. (Fonte: LORENZ E CYSEWSKI, 2000)

Palozza e colaboradores (2009) estudaram o efeito inibitório da astaxantina em células do câncer no cólon, sugerindo assim que a *Haematococcus pluvialis* pode proteger os humanos deste tipo de câncer.

Segundo Mata e colaboradores (2010) a microalga *Haematococcus pluvialis* pode apresentar um conteúdo de lipídeos de 25 % em peso seco de biomassa. Este um teor relevante em relação a outras espécies de microalgas como pode ser visto na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Comparação de teor de lipídeos em diferentes espécies de microalgas.

Espécie	Conteúdo de lipídeos (% de biomassa em peso seco)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0
<i>Chlorella Sp.</i>	10,0 – 48,0
<i>Dunaliella Salina</i>	6,0 – 25,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 – 71,0
<i>Dunaliella sp</i>	17,5 – 67,0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7 -29,7
<i>Spirulina platensis</i>	4,0 – 16,6
<i>Spirulina maxima</i>	4,0 – 9,0

(Adaptado de MATA, MARTINS *et al.*, 2010)

Issarapayup e colaboradores (2009) propuseram um sistema alternativo para cultivo de *Haematococcus pluvialis* que foi um fotobiorreator *airlift* tipo placa plana. Neste trabalho foram analisados alguns parâmetros e alguns de tipos de sistemas de fotobiorreatores *airlift* tipo placa plana. Em um destes sistemas foi possível obter uma densidade celular máxima de $4,1 \times 10^5$ células/mL e uma taxa específica de crescimento de $0,52 \text{ dia}^{-1}$.

O impacto da temperatura e da irradiância no crescimento da *Haematococcus pluvialis* foi estudado por Evens e colaboradores (2008). Os níveis ideais de temperatura e intensidade de luz têm sido apresentados nas faixas de 14 a 28 °C e 30 a 200 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Neste estudo a taxa máxima alcançada foi a 27 °C e 260 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Imamoglu e colaboradores (2007) investigaram cinco diferentes meios de cultura e três diferentes intensidades de luz. O melhor resultado conseguido foi uma concentração máxima celular foi de $9,5 \times 10^5$ células mL^{-1} , o que correspondeu a uma taxa específica de crescimento de $0,195 \text{ d}^{-1}$, obtido no meio de cultura Rudic (RM), com intensidade de luz de 40 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dessa forma, decidiu-se utilizar neste trabalho o meio de cultura RM, devido ao bom desempenho do cultivo neste sistema.

Em resumo, a justificativa para estudar a microalga *Haematococcus pluvialis* é devido aos seguintes fatores: interesse de cultivar microalgas para produção de astaxantina (utilização como pigmento, na aquicultura, na medicina) e para produção de bicomcombustíveis; é uma microalga densa e de fácil separação, dispensando a utilização de

floculantes na separação do meio de cultura; e, possui uma alta produtividade em comparação a outras microalgas.

2.7. Redes Neurais Artificiais

As aplicações envolvendo redes neurais artificiais se intensificaram a partir da década de 1980. Conforme Braga e colaboradores (2007) e Haykin (1994), uma Rede Neural Artificial (RNA) é um sistema paralelo distribuído composto por uma unidade de processamento simples (neurônio artificiais) que calculam determinadas funções matemáticas, normalmente funções não-lineares. Em linhas gerais, uma RNA representa uma opção de estrutura de modelo (Chen et al., 1990), potencialmente não linear, que pode ser utilizada em modelagem empírica quando não se conhece previamente uma estrutura de modelo padrão adequada para descrever o fenômeno.

As redes neurais têm sido aplicadas na área de modelagem de bioprocessos, sendo essencialmente um modelo entrada-saída capaz de extrair conhecimento através de dados do próprio processo. Topologicamente, uma RNA compreende um conjunto de unidades de processamento (neurônios artificiais) que transmitem sinais entre si através de conexões ponderadas. A Figura 2.9, representa a estrutura de um neurônio artificial. Segundo Ludwig Jr e Montgomery (2007) o neurônio artificial (ou matemático), similarmente ao natural recebe um ou mais sinais de entrada e devolve um único sinal de saída que alimentará neurônios em uma camada posterior.

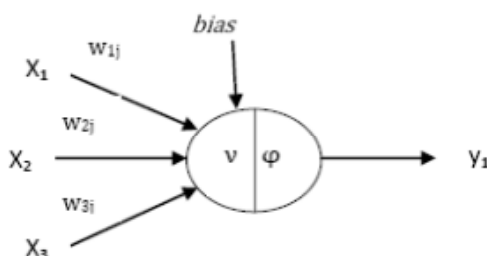


Figura 2.9 – Modelo do neurônio artificial.

O neurônio totaliza a função de combinação ou função de ativação, onde processa todos os estímulos ponderados pelos respectivos pesos.

$$\vartheta_j = \sum_{i=1}^n w_{ij} \cdot x_i + b_j \quad (2.16)$$

Segundo Ludwig Jr e Montgomery (2007) este valor é utilizado como argumento de uma função de transferência (ou função de ativação) que, quando for o caso, contemplam a característica não linear do modelo. As principais funções não lineares adotadas são a sigmoide e a tangente hiperbólica (eq.s 2.17 e 2.18). Ambas são contínuas e monotônicas o que representa uma característica positiva para a fase de treinamento (Quantrille e Liu, 1991). Conforme a classificação proposta por Hunt et al. (1992), ambas são diferenciáveis e do tipo degrau enquanto a função sigmóide é positiva e a função tangente hiperbólica é de média zero.

Função sigmóide:

$$\varphi(\vartheta) = \frac{1}{1 + e^{-\vartheta}} \quad (2.17)$$

Função tangente hiperbólica:

$$\varphi(\vartheta) = \tanh(\vartheta) \quad (2.18)$$

Do ponto de vista topológico, a arquitetura de rede com apenas uma camada intermediária com uma determinada quantidade de neurônios, N_h , e uma camada de saída com apenas um neurônio (neurônio de saída) (Figura 2.6.2) (Narendra e Parthasaraty, 1990, Zhan e Ishida, 1997). Esta estrutura se adequa perfeitamente para a identificação de modelos do tipo MISO (“Multiple Input Single Output”). Conforme Hunt et al. (1992), qualquer função contínua pode ser empiricamente representada por uma rede estruturada de acordo com a Figura 2.10, completamente conectada (Haykin, 1994), com uma única

camada intermediária, e cujos neurônios apresentam não linearidade descrita por uma função sigmóide ou tangente hiperbólica.

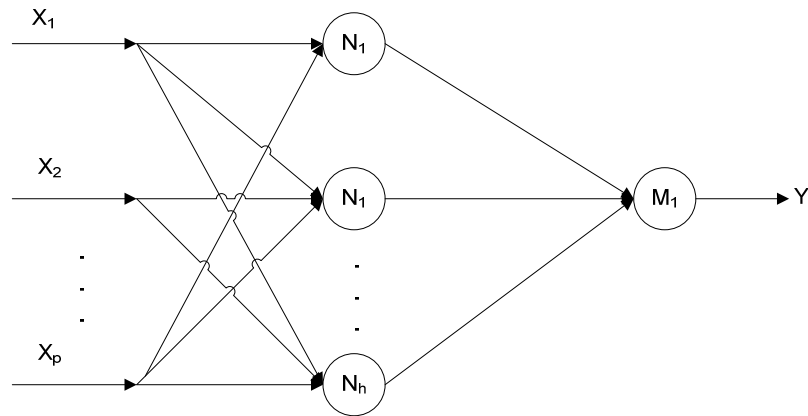


Figura 2.10 - Representação genérica de rede com N_h neurônios intermediárias e um neurônio na saída e p entradas.

3. METODOLOGIA

Este capítulo tem como objetivo apresentar os materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho e descrever os procedimentos para realização dos experimentos e análise dos dados. Os experimentos foram realizados em um anexo cedido ao Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC), na Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia.

3.1. Dados do Microorganismo

O microorganismo utilizado como inóculo foi a microalga *Haematococcus pluvialis* (Figura 3.1). Esta cepa é proveniente do banco de microalgas do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas, coordenado pelo Prof. Sérgio Lourenço (Universidade Federal Fluminense, RJ). Os microorganismos ficaram mantidos em uma câmara de fotoperíodo nas condições de temperatura de 295 ± 1 K e luminosidade de cerca $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A taxonomia para o microorganismo em estudo é:

- Reino: *Plantae*
- Filo: *Chlorophyta*
- Classe: *Chlorophyceae*
- Ordem: *Volvocales*
- Família: *Haematococcaceae*
- G\u00eanero: *Haematococcus*
- Esp\u00e9cie: *pluvialis*
- Nome bot\u00e2nico: *Haematococcus pluvialis*

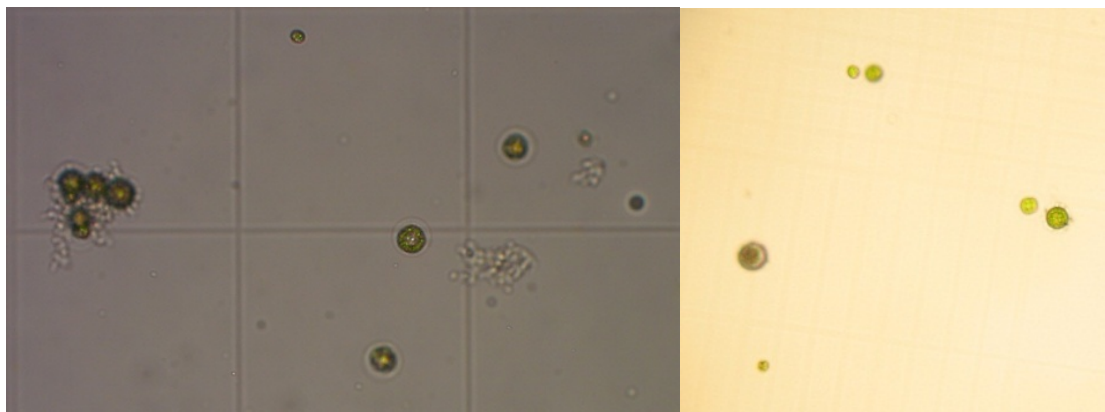


Figura 3.1 - Microalga *Haematococcus pluvialis*.

A Figura 3.2 apresenta a *Haematococcus pluvialis* em um estado excitação que pode ser provocado por uma alta intensidade de luz, alto pH do meio ou deficiência de algum nutriente. Nesta situação, a *Haematococcus pluvialis* pode passar a produzir o pigmento axtaxantina, que é um pigmento avermelhado produzido pela alteração na fisiologia da célula.

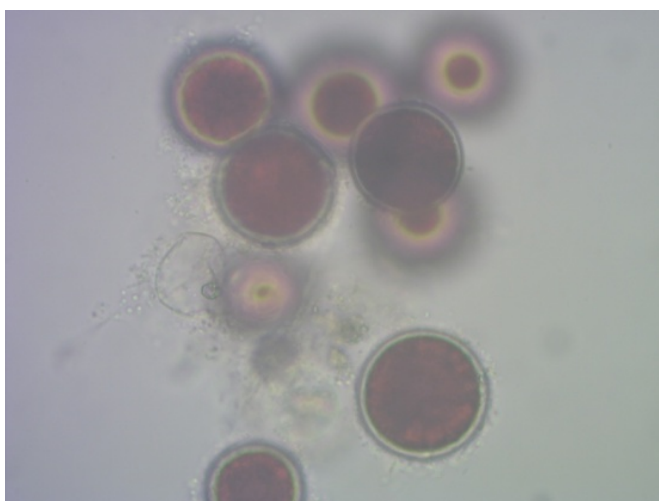


Figura 3.2 - Microalga *Haematococcus pluvialis* produzindo astaxantina.

Para produção e manutenção de cultivo foram utilizados erlenmeyers, béqueres, pipetas de Pasteur, proveta, dentre outros. Para as tampas de erlenmeyers foram utilizadas buchas feitas de algodão, papel madeira e ataduras de crepom. Todo material utilizado foi lavado e esterilizado em a 121 °C, 2 bar, por 30 min em uma autoclave vertical, marca Phoenix, Linha AVPlus.

3.2. Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio de Rudic (RM) citado Rudic e Dudnícenco (2000) e aplicado por Imamoglu e colaboradores (2007). A composição dos nutrientes está apresentada na Tabela 3.1 a seguir.

Tabela 3.1 – Composição dos Nutrientes para o meio de cultura RM.

Nutriente	RM (mg/L)
NaNO ₃	300
K ₂ HPO ₄	80
KH ₂ PO ₄	20
MgSO ₄ ·H ₂ O	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	58,5
EDTA	7,5
NaCl	20
H ₃ BO ₃	0,3
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,3
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,08
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,26
FeCl ₃ ·6H ₂ O	17

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 10 minutos. O equipamento utilizado para este procedimento foi uma autoclave vertical, marca Phoenix, Linha AVPlus.

Para medir a quantidade de nutrientes no meio, utilizou-se uma balança analítica da marca Satorious, modelo TE2145, com uma incerteza na medida de 0,0001 mg.

A justificativa para escolha deste meio de cultura é porque ele é concentrado, desta forma os nutrientes não limitariam o crescimento das microalgas. Além disso, a pesquisa feita por Imamoglu e colaboradores (2007) mostrou que este meio apresenta ótimos resultados para produção de biomassa.

3.3. Condições de Cultivo

Os experimentos foram realizados em um reator tipo placas planas (Figura 3.3), com dimensões 0,08 x 0,2 x 0,3 m. O volume reacional foi de 3,5 L, tendo-se 10% deste correspondente ao inóculo.

Nos reatores foram inseridos um sistema de borbulhamento de ar, com a utilização de um compressor de ar conectados a mangueiras, que por sua vez foram conectadas a três pipetas dentro do reator que dissipam o ar, garantindo um sistema de turbulência necessário para transferência de massa.

A intensidade de luz estudada foi na faixa de 2000 a 10000 lux, a temperatura foi mantida em 22 ± 1 °C e o pH variou de 6,5 a 12,5.



Figura 3.3 - Sistema reacional: Reator Placa.

Os reatores foram inoculados em uma capela de fluxo laminar (marca: Pachane) e depois foram transferidos para sala de experimentos com controle de temperatura e luminosidade do ambiente.

Para medida de intensidade de luz foi utilizado um luxímetro e/ou um radiômetro. Ambos os equipamentos for calibrados no Laboratório de Propriedades Óticas (LAPO), localizado no Instituto de Física da Universidade Federal da Bahia.

Para medidas do pH foi utilizado um pHmetro da Thermo Scientific, modelo Orion 3 star. A incerteza da medida neste equipamento é de 0,01. A calibração foi realizada utilizando tampão Orion Application Solution da Thermo Scientific.

3.4. Determinação da Biomassa

Para análise do aumento da biomassa microalgal foi utilizado o método de contagem em câmara de Neubauer (Lourenço, 2006) e utilizou-se um microscópio (Carl Zeiss – Axiostar Plus). As análises foram feitas em duplicata e o número de células foi determinado de acordo com Equação 3.1.

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10000 \quad (3.1)$$

Foram feitas também as análises por medidas de absorbância nos comprimentos de onda de 680 nm e 750 nm (KATSUDA *et al.*, 2004), utilizando um espectrofotômetro (Femto, 700 plus, incerteza na medida de 0,003). A partir dos resultados, calculou-se o peso seco pelo método de Katsuda (2004) utilizando a equação 3.2.

$$\text{Peso seco} = \left[-4,2 \times \frac{OD_{680} - OD_{750}}{OD_{680}} + 1,4 \right] \times OD_{680} \quad (3.2)$$

Onde, OD_{680} e OD_{750} são valores de densidade ótica para 680 nm e 750 nm respectivamente.

Os resultados obtidos de peso seco não foram satisfatórios e foram desconsiderados nesta análise. Estes dados são apresentados no Apêndice A. A incerteza destes dados pode está associado principalmente a falta de calibração do equipamento.

3.5. Planejamento Experimental

A produção de células vegetativas verdes do *Haematococcus pluvialis* não tolera alta irradiação e, logo, deve ser cultivada em condições de baixa intensidade de luz, no entanto este regime de pouca luz resulta em baixa velocidade de crescimento requerendo a adição de fontes orgânicas de carbono para melhorar o crescimento (GHIGGI, 2007; BOUSSIBA et al., 2000; GARCIA-MALEA et al., 2006).

Pela avaliação de estudos anteriores, nota-se que a variável que determina a taxa de crescimento da *Haematococcus pluvialis* é a intensidade luminosa. O pH é uma variável não controlada, que também pode interferir do crescimento.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a variável intensidade luminosa na produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis*. Os experimentos foram conduzidos, em bateleda, a uma faixa que variou de 10000 lux (ponto de alto) a 2000 lux (ponto de baixo) e o ponto central (6000 lux). Variáveis como temperatura, fluxo de aeração e composição do meio de cultura foram mantidas constantes.

A composição dos componentes do meio de cultura afeta mais a mudança metabólica da célula do que o crescimento da mesma, pois uma alteração na composição do meio faz a célula passar do crescimento vegetativo para o estado de acúmulo de carotenoides. Dessa forma foi desconsiderado o efeito desta variável no crescimento da célula.

Os experimentos foram feitos em duplicata no ponto central e na intensidade de 2000 lux. Para 10000 não se realizou a duplicata devido a limitações do laboratório.

Os experimentos com microalgas em geral necessitam de dias de observação, ao contrário de outros microorganismos como bactérias e leveduras, que levam horas para serem concluídos (GRIS, 2011). Como se tem a intenção de minimizar o tempo de realização dos experimentos, a análise da intensidade luminosa foi considerada suficiente para analisar o crescimento vegetativo produção *Haematococcus pluvialis*. Sendo assim a variável intensidade luminosa é uma limitação do modelo a ser estudado neste trabalho.

A segunda parte experimental foi feita com intuito de controlar o pH no meio de cultura. Desta forma, realizou-se injeção de CO₂ no meio de cultura a cada 6 horas ou a cada 12 horas. O pH foi ajustado para o valor de 6,5 quando o seu valor medido fosse maior que 9,0. Dessa forma-se se manteve o cultivo em um pH ideal, conservando as células em crescimento vegetativo, evitando o encistamento e a síntese de astaxantina. Os valores da intensidade luminosa avaliada neste caso foi de 50 e 90 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$, que correspondem a aproximadamente 4500 e 8500 lux respectivamente.

Experimentos adicionais foram feitos com o intuito de controlar o pH no meio de cultura. Desta forma, realizou-se injeção de CO₂ no meio de cultura a cada 6 horas ou a cada 12 horas. O pH foi ajustado para o valor de 6,5 quando o seu valor medido fosse maior que 9,0. Dessa forma-se se manteve o cultivo em um pH ideal, conservando as células em crescimento vegetativo, evitando o encistamento e a síntese de astaxantina. Os valores da intensidade luminosa avaliada neste caso foi de 50 e 90 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$, que correspondem a aproximadamente 4500 e 8500 lux respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados da produção de biomassa ao longo do tempo para intensidades diferentes intensidades de luz. De acordo com resultados foi proposto um modelo exponencial para representar a produção de biomassa. A taxa de crescimento desta produção foi determinada a partir da derivada da função exponencial proposta. Para representar o comportamento do pH foi proposto um modelo baseado em Redes Neurais Artificiais.

4.1. Modelo Proposto para Produção de Biomassa em diferentes Intensidades Luminosas

A curva de crescimento da biomassa possui um comportamento de uma curva sigmoideal, similar a um modelo dinâmico de um sistema de 2ª ordem com característica criticamente amortecido (Sthephanopoulos, 1984). Tendo-se a existência de um tempo morto (fase lag), conforme se constata através dos dados experimentais, chegou-se a uma curva de ajuste para o crescimento da biomassa descrita pela Equação 4.1.

$$\begin{cases} y(t) = y_0 + A \cdot \left[1 - \left(1 + \frac{t - t_m}{B} \right) \cdot e^{-\frac{t - t_m}{B}} \right] & \text{para } t > t_m \\ y(t) = y_0 & \text{para } t \leq t_m \end{cases} \quad (4.1)$$

Onde y corresponde a concentração de biomassa microalgal (células/mL), A (células/mL) e B (horas) são parâmetros da equação, t_m é tempo morto (horas), t é tempo (horas) e y_0 corresponde a concentração de biomassa inicial (células/mL). O tempo morto corresponde ao tempo referente fase lag ou fase de adaptação.

As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam os dados experimentais e a curva do modelo proposto para as intensidades luminosas de 2000, 6000 e 10000 lux, respectivamente. A Tabela 4.1 mostra os valores dos parâmetros A e B foram estimados para cada caso, com a utilização do software Matlab, considerando o tempo morto pré-fixado diretamente a partir

dos dados experimentais. Este ajuste da curva foi feito através da resolução de um algoritmo de mínimos quadrados não linear fixando-se uma região de busca (restrições de desigualdade) para os parâmetros.

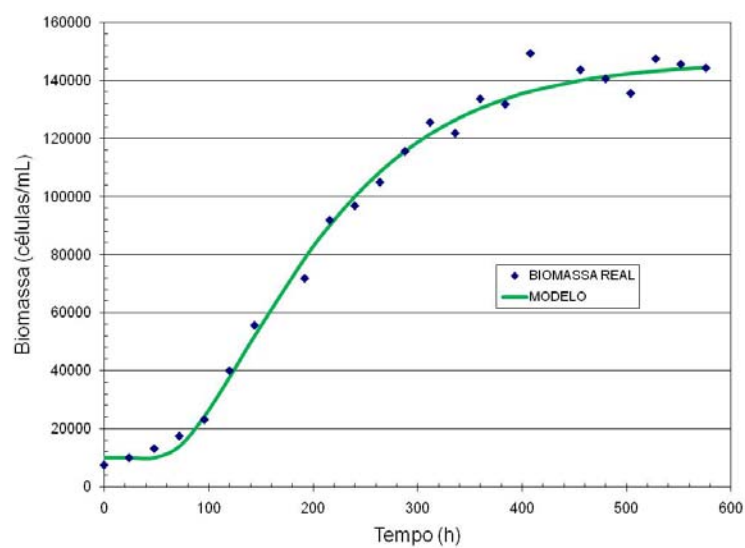


Figura 4.1 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h) para intensidade de luz de 2000 lux.

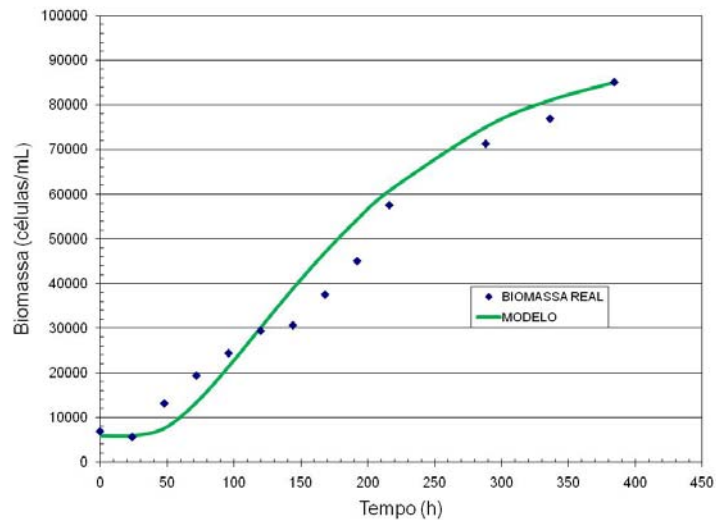


Figura 4.2 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h) para intensidade de luz de 6000 lux.

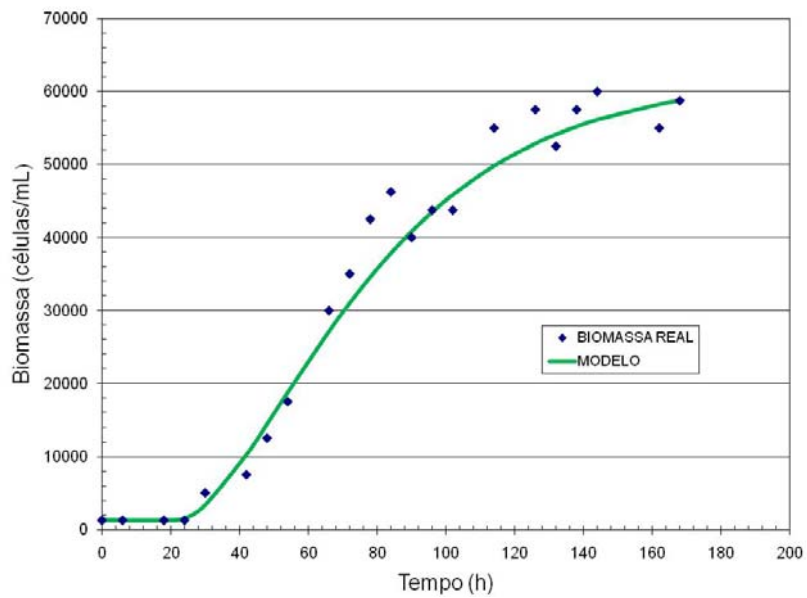


Figura 4.3 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h) para intensidade de luz de 10000 lux.

Tabela 4.1 – Parâmetros do modelo de produção de biomassa

Parâmetro	2000 lux	6000 lux	10000 lux
<i>A</i>	136264,83	86261,4	60475,7
<i>B</i>	84,02	86,24	30,86
<i>t_m</i>	50	30	21

Nota-se que o modelo exponencial proposto descreve de forma satisfatória o crescimento da biomassa para a faixa de luz analisada, onde os coeficientes de correlação para situação de 2000, 6000 e 10000 lux foram respectivamente 0,99; 0,97 e 0,98. Pelo teste-t, o valor do parâmetro *p* em todos os casos foi menor 0,005, isto implica que o valor do coeficiente de correlação é aceitável, considerando um intervalo de 95% de confiança.

O comportamento mostrado nas curvas anteriores pode ser explicado como mudanças na fisiologia celular. Foi observado que uma alta intensidade de luz gera uma quantidade menor de biomassa, devido à tendência das células de produzir pigmentos, retardando, assim, o crescimento.

Zang e colaboradores (2009) observaram que, se a alta intensidade da luz fosse imposta imediatamente após a inoculação, o cultivo torna-se amarelado e a taxa de crescimento reduzia consideravelmente, resultando numa redução total da biomassa. Para resolver este problema foi fornecida pouca luz no início do cultivo e, então aumentou-se gradualmente a intensidade da luz de acordo com o aumento da densidade celular. Os resultados mostraram que a elevação gradual da intensidade de luz foi benéfica tanto para o crescimento de células vegetativas móveis, quanto para a acumulação de astaxantina.

A partir dos valores dos parâmetros mostrados na Tabela 4.1, foi montado um modelo global, a fim de determinar a produção de biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* para qualquer intensidade de luz que esteja entre a faixa de 2000 a 10000 lux. O modelo global foi gerado ajustando os parâmetros em função da intensidade luminosa, segundo uma função polinomial. Desta forma, tem-se:

$$\begin{cases} y(t) = y_0 + A(L) \cdot \left[1 - \left(1 + \frac{t - t_m(L)}{B(L)} \right) \cdot e^{-\frac{t - t_m(L)}{B(L)}} \right] & \text{para } t > t_m(L) \\ y(t) = y_0 & \text{para } t \leq t_m(L) \end{cases} \quad (4.2)$$

onde L é a intensidade luminosa (lux).

Com o resultado do modelo global foram feitas análises em diferentes intensidades luminosas intermediárias as testadas experimentalmente (valores entre 3000 lux e 9000 lux) como indicado nas Figuras 4.4 e 4.5, que apresentam as curvas teóricas para diferentes intensidades de luz.

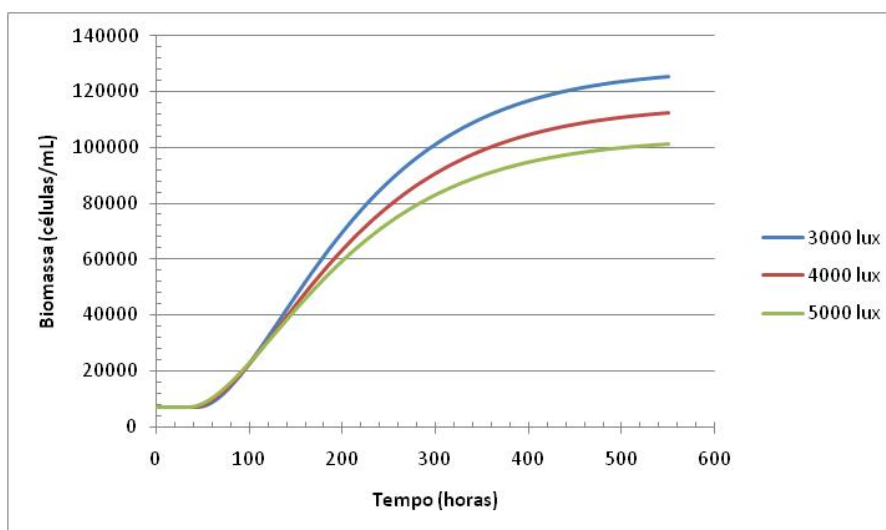


Figura 4.4 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h), para 3000, 4000 e 5000 lux.

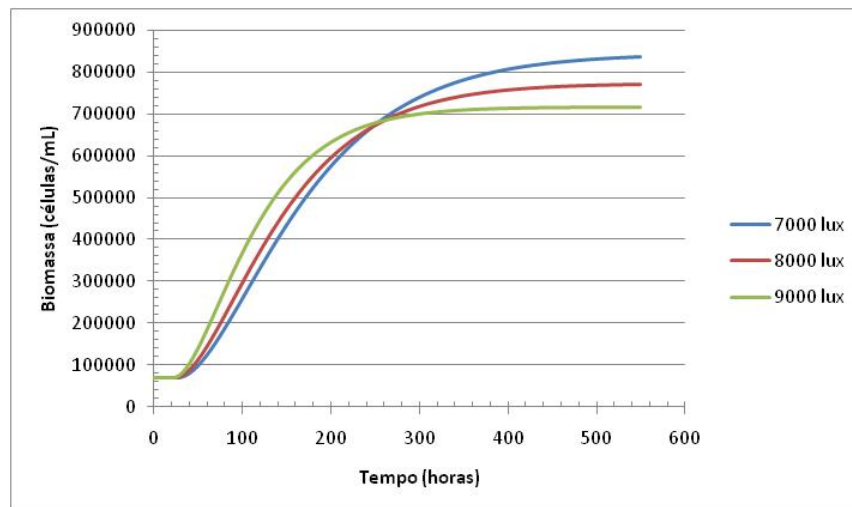


Figura 4.5 - Curva da Quantidade de Biomassa (células/mL) versus tempo (h), para 7000, 8000 e 9000 lux.

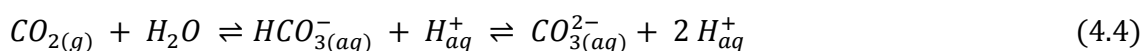
Para as intensidades de luz de 3000 até 5000 lux, ocorre uma redução da produção de biomassa final. Já nas intensidades de luz entre 7000 a 9000 lux, nota-se um aumento da taxa de crescimento na fase inicial, porém uma redução na quantidade de biomassa final no estado estacionário.

Resultados descritos por Boussiba e Vonshak (1991) e Zhang e colaboradores (2009) atestam que ocorre um aumento no acúmulo de astaxantina a elevadas intensidades luminosas, causado por mudanças do metabolismo celular, o que implica em uma alteração no crescimento das microalgas diminuindo a produção de biomassa final.

Quando a baixa intensidade de luz é mantida constante, geralmente não é o suficiente para o acúmulo de astaxantina, como foi observado por Dominguez-Bocanegra e colaboradores (2007). Dessa forma é compreensível a utilização de uma menor intensidade de iluminação para priorizar tanto células vegetativas em crescimento, quanto o acúmulo gradual de astaxantina no interior das células.

No processo de fotossíntese, representado pela equação 4.3 (TAIZ e ZEIGER, 2004), ocorre o consumo de dióxido de carbono, resultando um deslocamento do equilíbrio da

reação de dissolução deste gás em água (equação 4.4), favorecendo a diminuição de prótons H^+ no meio. Dessa forma, uma maior intensidade de luz favorece o processo, elevando pH, fato este observado durante os experimentos em batelada e sem controle de pH. Esta ocorrência caracteriza um meio em que as células de *Haematococcus Pluvialis*, apresentam um menor crescimento vegetativo.



Neste caso, elevada intensidade de luz pode gerar uma menor produtividade de biomassa resultante do aumento de pH sem controle. Dessa forma para se obter um sistema adequado de cultura em batelada sem controle de pH (pH entre 7 e 8) onde ocorra um crescimento vegetativo é recomendado usar uma intensidade de luz que varie de 2000 a 6000 lux. Caso, a intenção do cultivo seja para produção de astaxantina, o aumento de luz deve ser feito de maneira gradual, de forma a não diminuir a produtividade.

4.2. Cinética de Crescimento do Microorganismo

Segundo Flickinger (1999) um dos primeiros postulados em cinética microbiológica é que em condições ótimas de cultivos, sem nenhuma condição de restrição (o meio nutriente contem todos os componentes essenciais e parâmetros físico químicos são adequados) o aumento da biomassa (dx) durante um pequeno intervalo de tempo infinitesimal (dt) é proporcional a este intervalo de tempo e a concentração de biomassa instantânea (x).

$$dx = \mu x dt$$

Ou:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.5)$$

A equação 4.5 é válida para o experimento em batelada, como foi apresentado por Dunn e colaboradores (2000), onde μ representa a taxa específica de crescimento.

Neste trabalho foi proposto um modelo exponencial para produção de biomassa. Dessa forma, é possível calcular a taxa específica de crescimento em cada caso pela derivada da Equação 4.5.

$$\mu = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x}$$

$$\mu = \left[\left(\frac{-A \cdot \frac{1}{B \cdot e^{t-tm}}}{B} \right) - \left(\frac{t-tm}{B} + 1 \right) \left(\frac{B \cdot e^{t-tm}}{B} \right) \right] \left[\frac{1}{x} \right] \quad (4.6)$$

$$\mu = \left[\left(-A \cdot \frac{1}{e^{t-tm}} \right) - \left(\frac{t-tm}{B} + 1 \right) (e^{t-tm}) \right] \left[\frac{1}{x} \right] \quad (4.7)$$

Para cada intensidade de luz estuda, foi calculada a taxa específica de crescimento. O resultado está apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Taxa específica máxima de crescimento.

Intensidade de luz	$\mu_{max} (h^{-1})$
2000 lux	0,0235
6000 lux	0,0223
10000 lux	0,1266

Nota-se que para as intensidades de luz de 2000 e 6000 lux, os valores da taxa específica de crescimento foi bem próximo. Já, no sistema a 10000 lux, o valor desta taxa foi maior, porém, como foi visto na secção anterior, este crescimento acelerado não implica uma maior produtividade de biomassa. Pois a alta intensidade de luz desfavorece o crescimento vegetativo, provoca aumento do pH do meio e aumenta o acúmulo de astaxantina nas células da microalga *Haematococcus pluvialis*.

4.3. Modelo Autorregressivo para Predição de Comportamento dinâmico de pH em diferentes Intensidades Luminosas

O comportamento da curva de pH segue um modelo não linear que varia de acordo com intensidade luminosa. Para representar este sistema foi proposto um modelo autorregressivo não linear para predição do pH em função da quantidade de luz.

A configuração que forneceu melhores resultados foi de uma Rede com dois neurônios na camada intermediária e apenas um valor passado na camada de entrada. A Figura 4.6 apresenta a estrutura deste modelo que tem a capacidade de predizer, na forma recorrente, uma curva de evolução de pH ao longo do tempo. Os neurônios da camada intermediária contemplam uma função sigmóide e o neurônio da camada de saída contempla uma função linear.

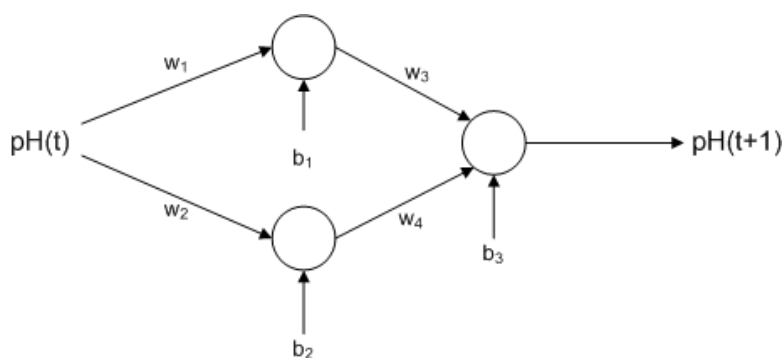


Figura 4.6 - Sistema proposto para RNA.

Neste caso tem-se sete parâmetros para serem estimado em cada caso de intensidade de luz. Os parâmetros são: W_1 , W_2 , b_1 , b_2 , W_3 , W_4 e b_3 .

O valor do pH predito pelo modelo é dado pela Equação 4.7.

$$pH(t + 1) = y_1 \cdot w_3 + y_2 \cdot w_4 + b_3 \quad (4.7)$$

Onde:

$$y_1 = \frac{1}{1+e^{-[pH(t) \cdot w_1 + b_1]}} \quad (4.8)$$

e

$$y_2 = \frac{1}{1+e^{-[pH(t) \cdot w_2 + b_2]}} \quad (4.9)$$

Após ajustado a melhor estrutura para RNA (2 neurônio e 1 valor passado), foi feito o ajuste dos parâmetros para cada intensidade de luz, a fim de montar um modelo global e poder prever o pH para outras faixas de luz que estejam entre o range analisado. A Tabela 4.3 apresenta os valores estimados para parâmetros da RNA.

Tabela 4.3 – Valores estimados dos parâmetros da RNA para diferentes intensidades de luz.

Parâmetro	Valor estimado em 2000 lux	Valor estimado em 6000 lux	Valor estimado em 10000 lux
W_1	131	14,4804	11,7677
W_2	-2	-14,4288	-9,738
b_1	-120	-11,9048	-11,8764
b_2	-11	0,7268	4,4785
W_3	-3	0,1258	-2,4275
W_4	-37525	-2,0904	-0,9183
b_3	1	0,8015	1,1331

As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 apresentam a curva do modelo proposto pela RNA e dados experimentais para intensidade de 2000, 6000 e 10000 lux respectivamente.

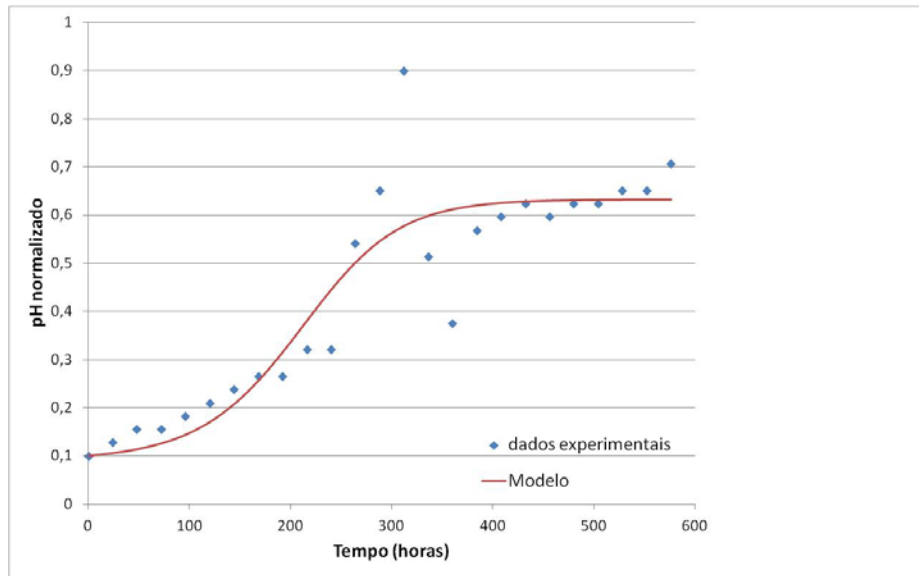


Figura 4.7 - Comportamento do pH para 2000 lux.

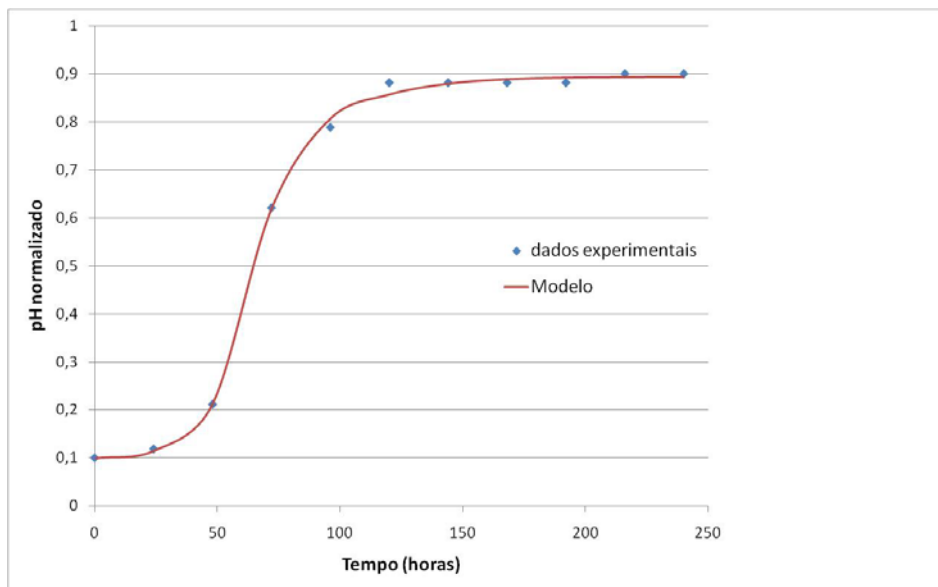


Figura 4.8 - Comportamento do pH para 6000 lux.

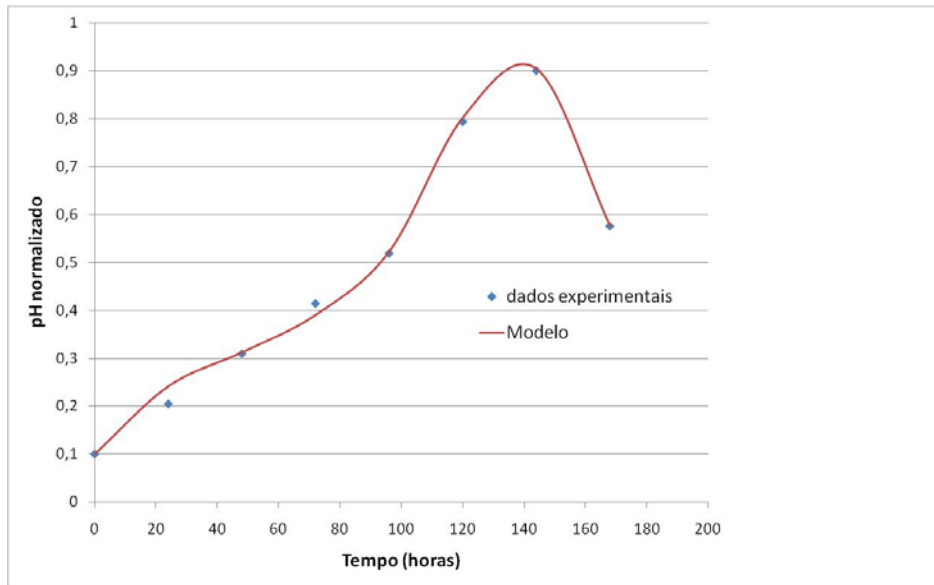


Figura 4.9 - Comportamento do pH para 10000 lux.

Os coeficientes de correlação calculado para o ajuste da curva de pH para 2000, 6000 e 10000 lux foram de 0,9076; 0,9995 e 0,9982 respectivamente.

A Figura 4.10 apresenta o comportamento do pH simulado para faixa de lux de 2000 a 10000 lux. Nota-se que quanto maior for a taxa de lux incidente no meio, mais rapidamente o pH aumenta, desfavorecendo assim o crescimento microbiano e favorecendo a produção de astaxantina. Isso justifica o fato de apresentar uma maior taxa específica de crescimento para os experimentos 2000 do que a 10000 lux.

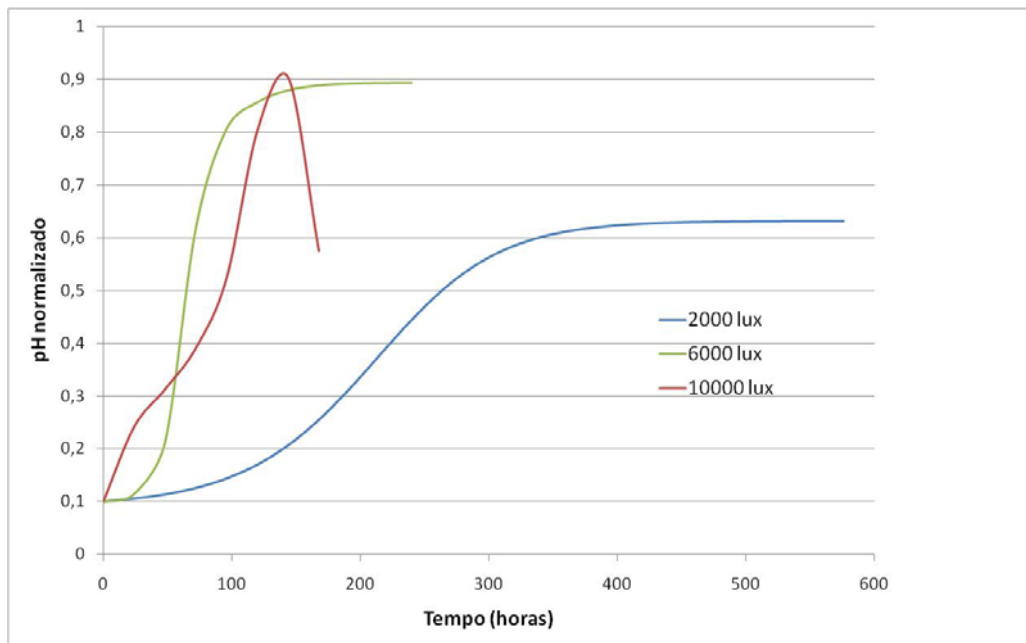


Figura 4.10 - Modelo do comportamento do pH para faixas de luz de 2000 a 1000 lux.

A avaliação do pH no cultivo é de grande importância, pois assim como foi abordado por Khalil e colaboradores (2010), a concentração de íons de hidrogênio (pH) do meio de cultura é um dos fatores mais importantes que pode afetar o crescimento ideal das algas, visto que pH é significativo para caracterizar o metabolismo dos microorganismos e, portanto, para determinar a biossíntese de produtos bioativos como metabólitos secundários.

4.4. Experimentos com Controle de pH

O pH é uma propriedade físico-química que tem seu valor afetado devido a realização de fotossíntese pelas células meio de cultura. Nota-se que quando o pH é elevado, ocorre também uma diminuição do crescimento vegetativo das células, resultando no aumento da produção de pigmentos nas células da *Haematococcus pluvialis*.

A taxa de crescimento de cultivos essencialmente fotoautotróficos depende da oferta suficiente de substrato de carbono para a fotossíntese. A adição de CO₂ no meio de cultura, não só contribui para o consumo de fonte de carbono pelas células, mas também ajuda a manter o pH do meio (ZHANG *et al.*, 2009)

A espécie *Haematococcus pluvialis*, normalmente, crescem de maneira satisfatória em culturas com condições moderadas, isto é, com pouco sal e com pH ideal em torno de 7,0-8,0 (HARKER *et al.*,1996; SARADA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2009). Nesta etapa do trabalho são apresentados resultados experimentais que envolveram controle de pH pela injeção de CO₂ no meio de cultura a cada 6 horas ou a cada 12 horas. O pH foi ajustado para o valor de 6,5 quando o seu valor medido fosse maior que 9,0. Dessa forma-se se manteve o cultivo em um pH ideal, conservando as células em crescimento vegetativo, evitando o encistamento e a síntese de astaxantina.

A Figura 4.11 apresenta a curva da produção de biomassa em função do tempo para intensidades de luz de 50 e 90 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (aproximadamente 4500 e 8500 lux, respectivamente) na qual \u00e9 poss\u00edvel observar que quando ocorre esse controle de pH no meio, o sistema tende a permanecer em um meio de condi\u00e7\u00f5es favor\u00e1veis de crescimento (concentra\u00e7\u00e3o adequada de nutrientes, pH entre 7,0-8,0 e temperatura, entre outros), retardando o efeito da altera\u00e7\u00e3o metab\u00f3lica (produ\u00e7\u00e3o de astaxantina) e tamb\u00e9m retardando o efeito do decaimento celular

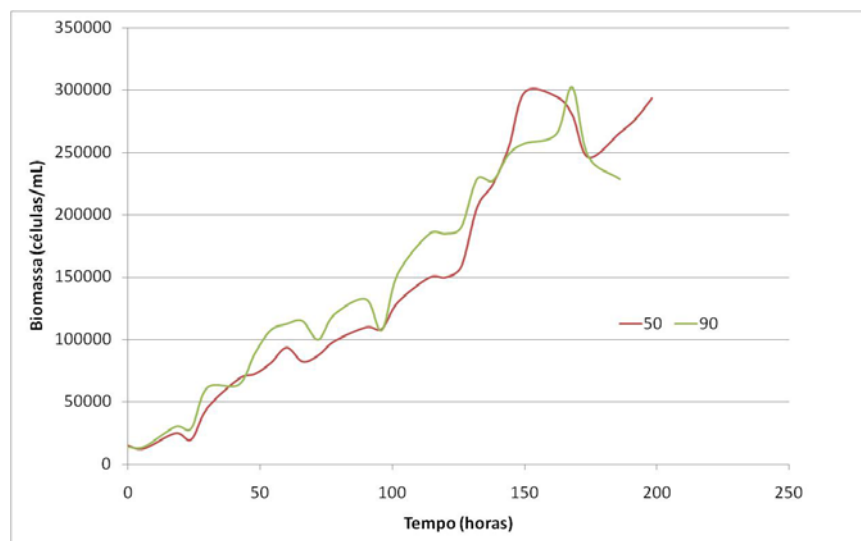


Figura 4.11 - Comportamento da produção de biomassa em função de tempo para intensidades de luz de 50 e 90 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Vale ressaltar, ainda, que o pH ótimo difere de acordo com diferentes espécies de microalgas. Além disso, algumas espécies podem tolerar uma ampla faixa de pH, como é o caso da *Dunaliella salina* que suporta uma ampla faixa de valores de pH entre 5,5 e 10, como citado por Khalil e colaboradores (2010).

Como foi explicado na seção 4.1 inibição de crescimento da microalga em pH alcalino elevado (acima de 10) ocorre porque íons carbonato (CO_3^{2-}) é a forma dominante de carbono inorgânico e o íon bicarbonato (HCO_3^-) é a forma utilizada pelo microorganismos (Khalil et al., 2010). Uma quantidade significativa de bicarbonato (HCO_3^-) pode passar para tilacóides onde o pH é próximo de 5 e desidratar a CO_2 . Este CO_2 resultante pode em seguida, fugir dos tilacóides.

Os resultados deste trabalho indica que o controle de pH no cultivo é fundamental para o sucesso do cultivo maciço de *Haematococcus*, e que um borbulhar CO_2 no sistema é eficiente para o suplemento de fonte de carbono para fotossíntese e para manutenção do pH. Porém, tal fato requer um maior custo e certo grau de automação, dificultando assim sua viabilidade.

5. CONCLUSÕES

5.1. Considerações Finais

Neste trabalho foi possível construir um modelo empírico global para predição de biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* em um range de intensidade luminosa que variou de 2000 a 10000 lux. Foi possível também modelar o comportamento do pH através de um modelo de redes neurais artificiais para intensidades de luz de 2000 a 10000 lux.

O aumento da intensidade luminosa, apesar de poder acelerar o crescimento das microalgas, também pode provocar uma redução na quantidade de biomassa produzida, visto que, quanto maior a irradiância no meio, maior será a taxa do processo fotossintético, e por consequência maior será o pH do meio. Nota-se, portanto, que a elevação da intensidade de luz provoca uma desaceleração no crescimento vegetativo da microalga *Haematococcus pluvialis* e um aumento da tendência de acúmulo do pigmento astaxantina.

Observou-se também que nos experimentos onde houve controle de pH pela adição de CO₂ no meio de cultivo, houve pouca diferença na quantidade de biomassa produzida, sendo esta variável independente da intensidade de luz incidente no meio. Neste experimento também não ocorreu a produção do pigmento astaxantina.

Conclui-se que os parâmetros reacionais deverão ser determinados de acordo com o destino da biomassa formada. Caso precise uma grande quantidade de biomassa para extração de lipídeos, sugere-se trabalhar com uma intensidade de luz mais baixa. Caso necessite de uma grande quantidade de biomassa para extração de astaxantina, sugere-se iniciar a produção com uma intensidade de luz mais baixa e executar um aumento gradual desta intensidade de luz.

5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Para aprimorar os estudos na produção de biomassa de microalgas sugerem-se os seguintes trabalhos:

- Analisar o efeito da transferência de massa na cinética de crescimento das microalgas, isto é, verificar a influência do fluxo de ar no meio reacional.
- Analisar a influência de outros componentes do meio reacional (influência dos nutrientes) na produção de biomassa.
- Estender os estudos para outras espécies de microalgas.
- Executar uma avaliação econômica e ambiental da produção de biomassa de microalgas.
- Avaliar a composição do óleo de microalgas.
- Ampliar os estudos em escala piloto.

REFERÊNCIAS

- AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 7, p. 1834-1840, Jul 2009.
- ANDREWS, J. F. A Mathematical model for continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707-&, 1968.
- BENEMANN, J. R., Opportunities and Challenges in Algae Biofuels Production, 2008.
- BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant Cell Physiol.** 32, 1077–1082, 1991.
- BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A. Procedure for large scale production of astaxanthin from *haematococcus*. U S Patent 6022701, Feb. 2000.
- BRAGA, A.P.; CARVALHO, A.P.L.F.; LUDERMIR, T.B. Redes Neurais Artificiais: Teoria e Aplicações, 2. Ed, LTC, Rio de Janeiro, 2007.
- CARLOZZI, P.; PINZANI, E. Growth characteristics of *Arthrospira platensis* cultured inside a new close-coil photobioreactor incorporating a mandrel to control culture temperature. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 675-684, Jun 20 2005.
- CELEKLI, A.; BALCI, M.; BOZKURT, H. Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8742-8747, Dez 2008.
- CELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M.; BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3625-3629, Jul 2009.
- CHEN, S.; BILLINGS, S. A.; GRANT, P. M., *Non-Linear System Identification Using Neural Networks*, **Int. J. Control**, vol. 51, no 6, 1191-1214, 1990.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

_____. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461-465, 2004.

CRUTZEN, P. J. et al. N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 8, n. 2, p. 389-395, 2008.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; PONCE-NOYOLA, T.; TORRES-MUNOZ, J. A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 783-791, 2007.

DONG, Q. L.; ZHAO, X. M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today**, v. 98, n. 4, p. 537-544, Dez 2004.

DUNN, I. J. et al. *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, 2 ed. Wiley – Vch, 2000.

EVENS, T. J.; NIEDZ, R. P.; KIRKPATRICK, G. J. Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 411-422, Ago. 2008.

FLECK-SCHNEIDER, P.; LEHR, F.; POSTEN, C. Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum*. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 2, p. 134-141, Oct. 2007.

FLICKINGER, M. C. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, John Wiley & Sons, 1999.

GARCÍA-MALEA, M.C.; ACIÉN, F.G.; FERNÁNDEZ, J.M.; CERON, M.C.; MOLINA, E. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 981–989, Ago. 2006.

GHIGGI, Vanessa. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento staxantantina por *Haematococcus pluvialis***, Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

GRIS, Lara Regina Soccol, **Produção da Microalga *Nannochloropsis oculata* em Fotobiorreator *Airlift***, Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HARKER, M.; TSAVALOS, A. J.; YOUNG, A. J. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 207-214, 1996.

HAYKIN, S., *Neural Networks; A Comprehensive Foundation*, **Prentice-Hall, Inc.**, 1994.

HUNT K. J.; SBARDARO D.; ZBIKOWSKI, R.; GAWTHROP P. J. *Neural Networks for Control Systems – A Survey*, **Automatica**, vol. 28, no 6, 1083-1112, 1992.

IMAMOGLU, E.; SUKAN, F. V; DALAY, M. C. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. **International Journal of Natural and Engineering Sciences**, v. 3, 2007.

ISSARAPAYUP, K.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 3-4, p. 227-232, 2009.

JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1406-1413, Fev. 2010.

KATSUDA, T. et al. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 81-86, 2004.

KHALIL, Z. I. et al. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1225-1231, Jul. 2010.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 160-167, Abr. 2000.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. Rima, São Carlos, 2006.

LUBISCO, N. M. L.; VIEIRA, S.C.; SANTANA, I. V. Manual de estilo acadêmico: monografias, dissertações e teses. 3 ed. Salvador, 2007.

LUDWIG JR., O. e COSTA, E. M. M. Redes Neurais Artificiais e Aplicações com Programas em C, Editora Ciência Moderna, Rio de Janeiro, 2007.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, Jan. 2010.

MERCHUK, J. C.; WU, X. Modeling of photobioreactors: Application to bubble column simulation. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 163-170, 2003.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, p. 371 -394, 1949.

NARENDRA, K. e PARTHASARATHY, K., *Identification and Control of Dynamical Systems Using Neural Networks*, **IEEE Transactions on Neural Networks**, vol. 1, no 1, 1990.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; DOS SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. *Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas*. **INSULA**. Brasil, 36, 39-74, 2007.

PALOZZA, P. et al. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 283, n. 1, p. 108-117, Set. 2009.

PATIL, V.; TRAN, K. Q.; GISELROD, H. R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1188-1195, 2008.

PEREZ, E. B.; PINA, I. C.; RODRIGUEZ, L. P. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 520-525, 2008.

QUANTRILLE T. E. e LIU Y. A., *Artificial Intelligence in Chemical Engineering*, **Academic Press, Inc.**, 1991.

QUINN, J.; DE WINTER, L.; BRADLEY, T. Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5083-5092, Abr. 2011.

RANGEL-YAGUI, C. D. et al. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 133-141, Abr. 2004.

RICHMOND, A. Biological principles of mass Cultivation. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004.

RUDIC V. e DUDNÍCENCO T., Process For Cultivation of Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). MD Patent Nr. A 2000 0154, 2000.

SARADA, R.; TRIPATHI , U.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 623–627, 2002.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*, vol 2, Blucher, São Paulo, 2001.

SKJANES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. BiOCO₂ - A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 405-413, 2007.

SOLOVCHENKO A. R. et al. Effects of light intensity and nitrogen starvation growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 245–251, 2008.

STHEPHANOPOULOS, G. **Chemical Process Control**, Prentice-Hall, 1984.

TAIZ, L. e ZEIGER, E., **Fisiologia Vegetal**, 3ed, Artmed, Porto Alegre, 2004.

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

YOKOTA, T. et al. A new growth kinetic-model for photo-autotrophic microalgae culture. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 27, n. 3, p. 399-403, Jun. 1994.

YUN, Y. S.; PARK, J. M. Kinetic modeling of the light-dependent photosynthetic activity of the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 303-311, Aug. 2003.

ZHANG, B. Y. et al. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, n. 3-4, p. 275-281, Out. 2009.

ZHAN J. e ISHIDA M., *The Multi-Step Predictive Control of Nonlinear SISO Processes with a Neural Model Predictive Control (NMPC) Method*, **Computers Chem. Engng**, vol. 21, no 2, 201-210, 1997.

APÊNDICE A

Resultados da Análise da Biomassa.

A Figura A.1 apresenta os resultados para os dados de peso seco, utilizando o método de Katsuda para o experimento com irradiância de 2000 lux.

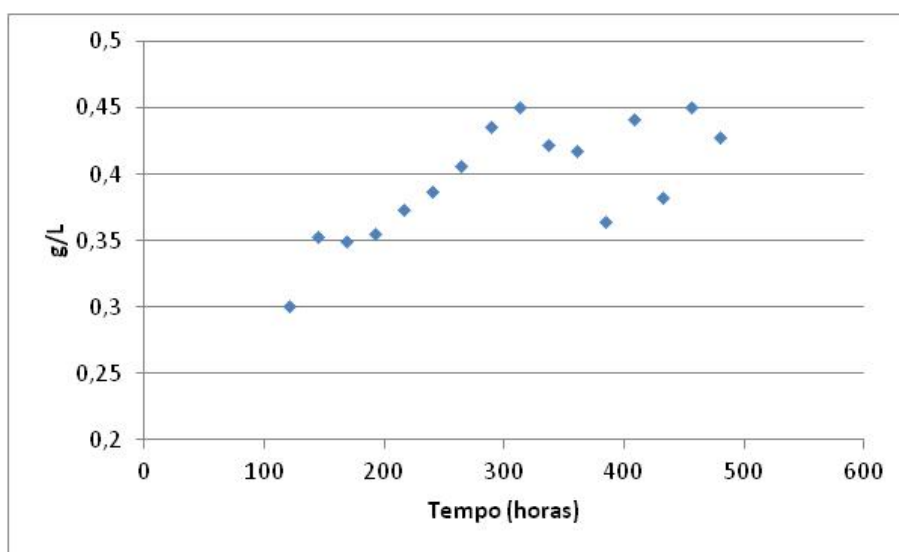


Figura A.1 – Valor do peso seco para intensidade luminosa de 2000 lux.

APÊNDICE B

Resultados Experimentais Tabelados

As Tabelas B.1, B.2 e B.3 apresentam os resultados da contagem de células (biomassa,) o valor calculado pelo modelo, e o valor do desvio relativo.

O desvio relativo foi calculado por:

$$\text{Desvio relativo} = \frac{\text{valor experimental} - \text{valor do modelo}}{\text{valor experimental}} \times 100$$

Tabela B.1 – Resultados para intensidade luminosa de 2000 lux.

Tempo (h)	Biomassa Experimento 1 (células/mL)	Biomassa Experimento 2 (células/mL)	Média Biomassa (células/mL)	Modelo (células/mL)	Desvio Relativo (%)
0	8750	6250	7500	10000,00	33,33
24	10000	10000	10000	10000,00	0,00
48	12500	13750	13125	10000,00	23,81
72	15000	20000	17500	13930,60	20,40
96	22500	23750	23125	24298,50	5,07
120	38750	41250	40000	37684,21	5,79
144	51250	60000	55625	51947,96	6,61
192	60000	83750	71875	78631,89	9,40
216	88750	95000	91875	90039,56	2,00
240	93750	100000	96875	99953,80	3,18
264	96250	113750	105000	108412,47	3,25
288	106250	125000	115625	115526,81	0,08
312	126250	125000	125625	121442,67	3,33
336	125000	118750	121875	126316,39	3,64
360	143750	123750	133750	130300,62	2,58
384	136250	127500	131875	133536,49	1,26
408	153750	145000	149375	136149,92	8,85
456	133750	153750	143750	139931,61	2,66
480	141250	140000	140625	141272,12	0,46
504	131250	140000	135625	142337,48	4,95
528	143750	151250	147500	143181,65	2,93
552	136250	155000	145625	143848,79	1,22
576	137500	151250	144375	144374,74	0,00

Tabela B.2 – Resultados para intensidade luminosa de 6000 lux.

Tempo (h)	Biomassa Experimento 1 (células/mL)	Biomassa Experimento 2 (células/mL)	Média Biomassa (células/mL)	Modelo (células/mL)	Desvio Relativo (%)
0	7500	6250	6875	6000,00	12,73
24	6250	5000	5625	6000,00	6,67
48	8750	17500	13125	7636,87	41,81
72	18750	20000	19375	13443,62	30,61
96	22500	26250	24375	21423,07	12,11
120	27500	31250	29375	30176,95	2,73
144	25000	36250	30625	38858,11	26,88
168	33750	41250	37500	46985,29	25,29
192	40000	50000	45000	54315,35	20,70
216	52500	62500	57500	60755,96	5,66
288	66250	76250	71250	74974,72	5,23
336	76250	77500	76875	80971,77	5,33
384	91250	78750	85000	84998,75	0,00

Tabela B.3 – Resultados para intensidade luminosa de 10000 lux.

Tempo (h)	Biomassa Experimental (células/mL)	Modelo (células/mL)	Desvio Relativo (%)
0	1250	1250,00	0,00
6	1250	1250,00	0,00
18	1250	1250,00	0,00
24	1250	1517,90	21,43
30	5000	3372,49	32,55
42	7500	10264,09	36,85
48	12500	14455,12	15,64
54	17500	18771,75	7,27
66	30000	27138,90	9,54
72	35000	30997,94	11,43
78	42500	34573,06	18,65
84	46250	37844,12	18,17
90	40000	40806,95	2,02
96	43750	43468,35	0,64
102	43750	45842,34	4,78
114	55000	49804,45	9,45
126	57500	52862,19	8,07
132	52500	54106,04	3,06
138	57500	55187,05	4,02
144	60000	56123,93	6,46
162	55000	58233,82	5,88
168	58750	58750,45	0,00

UFBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA
CEP: 40.210-630
Telefone: (71) 3283-9800
E-mail: pei@ufba.br
Home page: <http://www.pei.ufba.br>

