



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA

VINÍCIUS MOLINI BENEDITO

**EFEITOS DA LUMINOSIDADE E USO DE ESTRUVITA
($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) NO CULTIVO DA MICROALGA
*Nannochloropsis oculata***

SÃO MATEUS - ES

2020

VINÍCIUS MOLINI BENEDITO

**EFEITOS DA LUMINOSIDADE E USO DE ESTRUVITA
(MgNH₄PO₄.6H₂O) NO CULTIVO DA MICROALGA
*Nannochloropsis oculata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Energia, do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Energia, na área de concentração: Engenharia, Tecnologia e Gestão.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Randow de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Porto

SÃO MATEUS - ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B463e Benedito, Vinícius Molini, 1994-
Efeitos da luminosidade e uso de estruvita
($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) no cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* / Vinícius Molini Benedito. - 2020.
117 f. : il.

Orientador: Rodrigo Randow de Freitas.
Coorientador: Paulo Sérgio da Silva Porto.
Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Algas Marinhas - Cultura e meios de cultura. 2. Modelagem. 3. Biocombustíveis. 4. Resíduos industriais. I. Freitas, Rodrigo Randow de. II. Porto, Paulo Sérgio da Silva. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. IV. Título.

CDU: 620.9

VINICIUS MOLINI BENEDITO

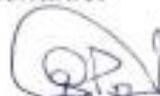
Efeitos da luminosidade e uso de estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) no cultivo da Microalga *Nannochloopsis oculata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. Rodrigo Randow de Freitas
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador


Prof. Dr. Paulo Sergio da Silva Porto
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador


Prof.ª Dr.ª Taisa Shimosakai de Lira
Universidade Federal do Espírito Santo


Prof.ª Dr.ª Lalane Alves de Andrade
Universidade Federal de Goiás

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me iluminar em todos os momentos, me concedendo força, sabedoria e coragem.

Aos meus orientadores, Dr. Rodrigo Randow de Freitas e Dr. Paulo Sérgio da Silva Porto, pelo apoio, atenção, ideias e ensinamentos de fundamental importância no desenvolvimento deste trabalho. Aos demais professores do curso de pós-graduação em energia, pelo conhecimento passado.

Aos Servidores do CEUNES/UFES, em especial aos técnicos de laboratório Jean Carlos Fiorotti e Pedro Couto, e à equipe da Secretaria de Pós-Graduação-SUPGRAD.

À minha família e amigos que sempre torceram por mim e me apoiaram em todos os momentos.

A Larissa, por todo apoio, amor e compreensão pelas muitas horas que não pude lhe dedicar.

Ao LabPetro (UFES, Brasil) pela a realização das análises de FTIR, termo de Cooperação n.º. 0050.0022844.06.4.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A utilização de microalgas, no âmbito das energias renováveis, recebe grande atenção na atualidade devido à enorme procura mundial por fontes energéticas sustentáveis, muito por possuir elevado rendimento fotossintético, conduzindo a grandes produções de biomassa e elevado teor lipídico. Entretanto, para que o biodiesel produzido alcance valores competitivos no mercado, ainda existem muitos desafios tecnológicos. No que tange o cultivo, o aumento da densidade microalgal é um fator importante para tornar essa tecnologia viável, em especial, visando a redução de custos. Por exemplo, significativas reduções de custos seriam obtidas se os nutrientes pudessem ser obtidos de forma mais acessível, do ponto de vista financeiro e ambiental, e mantendo condições otimizadas de cultivo. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo analisar o cultivo de microalgas, da espécie *Nannochloropsis oculata*, utilizando estruvita (precipitado de efluente) como nutriente rico em nitrogênio e fósforo, e analisar a influência de diferentes condições de luminosidade no cultivo por meio dos ajustes de modelos matemáticos aos dados de crescimento microalgal. Os modelos estudados descreveram de forma satisfatória o crescimento da biomassa para as condições de luminosidade 24_h luz: 00_h escuro e 12_h luz: 12_h escuro, com coeficientes de correlação variando de 0,999 a 0,991. O modelo de Stephanopoulos foi o que apresentou menores desvios em relação aos dados experimentais. A modelagem matemática e os dados experimentais mostraram que a condição de luminosidade 12_h luz: 12_h escuro otimiza os valores de densidade celular ($241,527 \times 10^4$ células.mL⁻¹) e teor de bio-óleo (20,019%), gerando ainda uma redução de 0,56 KWh para cada litro de cultivo. A análise do planejamento fatorial 2³, mostrou o potencial de utilização de estruvita como fonte de fósforo em cultivo de microalgas e o bio-óleo proveniente deste cultivo possui características similares ao obtido por nutrientes convencionais.

Palavras-chave: microalga, bio-óleo, modelagem, *Nannochloropsis oculata*.

ABSTRACT

The use of microalgae in the field of renewable energy is receiving great attention today due to the huge worldwide demand for sustainable energy sources, due to its high photosynthetic yield, leading to high biomass production and high lipid content. However, for the biodiesel produced to reach competitive values in the market, there are still many technological challenges, especially regarding the cost reduction in the microalgal cultivation stages. For example, significant cost reductions would be obtained if nutrients could be obtained more affordably from a financial and environmental point of view while maintaining optimal cultivation conditions. Thus, the present study aims to analyze a cultivation of microalgae of the species *Nannochloropsis oculata*, using struvite as nutrient, and also to obtain microalgal growth models under different light conditions. The studied models described satisfactorily the growth of biomass for the conditions of luminosity 24_h light: 00_dark and 12_h light: 12_h dark, with correlation coefficients from 0.999 to 0.991. Stephanopoulos' model showed the least deviations from the experimental data. Mathematical modeling and experimental data showed the luminous condition 12_h light: 12_h dark optimizes the values of cell density (241.527×10^4 cells.mL⁻¹) and bio-oil content (20.019%), still generating a reduction of 0.56 KWh for each liter of cultivation. The analysis of 2³ factorial design, using struvite as nutrient in different proportions, showed the potential of using struvite as a source of phosphorus in microalgae cultivation and its bio-oil has similar characteristics to that obtained by conventional nutrients.

Key words: microalgae, bio-oil, modeling, *Nannochloropsis oculata*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Problema de pesquisa.....	15
1.2. Justificativa.....	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1. Microalgas.....	18
3.2. <i>Nannochloropsis oculata</i>	19
3.3. Meios de cultivo microalgal	21
3.4. Tipos de cultivo microalgal	21
3.5. Fatores propícios para crescimento microalgal.....	23
3.5.1. Carbono	23
3.5.2. Nitrogênio.....	23
3.5.3. Fósforo.....	24
3.5.4. Outros micronutrientes / elementos	24
3.5.5. Concentração e absorção de CO ₂	25
3.5.6. Luminosidade.....	25
3.5.7. Temperatura de cultivo	26
3.5.8. pH	27
3.5.9. Efeito do fluxo de gás na mistura de culturas	27
3.6. Estruvita	28
3.7. Sistemas de cultivo microalgal	29
3.7.1. Sistemas abertos	29
3.7.2. Sistemas fechados.....	31
3.7.3. Sistemas de fotobiorreatores híbridos	33
3.8. Regimes de cultivo de microalgas.....	33
3.8.1. Batelada.....	33
3.8.2. Semicontínuo	34
3.8.3. Contínuo	34
3.9. Curva de crescimento de microalgas	35
3.10. Separação da biomassa e extração de lipídios.....	38

4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Análise Bibliométrica	39
4.1.1. Modelagem de crescimento de microalgas	39
4.1.2. Utilização de estruvita como nutriente para cultivo de microalgas	40
4.2. Meio de cultivo padrão	40
4.3. Aparato experimental	41
4.4. Contagem celular e padronização da concentração inicial	42
4.5. Metodologia experimental e analítica	44
4.5.1. Cultivo padrão.....	44
4.5.2. Determinação do crescimento celular por espectroscopia UV- vis.....	44
4.5.3. Determinação do teor de bio-óleo por infravermelho	44
4.6. Determinação dos parâmetros de crescimento celular	45
4.6.1. Taxa de Crescimento Específico (μ):	45
4.6.2. Velocidade de crescimento (k):.....	46
4.7. Análise das condições de luminosidade no crescimento microalgal ...	46
4.7.1. Abordagem experimental.....	46
4.7.2. Modelagem matemática.....	47
4.8. Metodologia estatística para análise do uso de estruvita como nutriente.....	48
4.9. Separação da biomassa e extração do bio-óleo via Soxhlet.....	49
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	51
5.1. Análise Bibliométrica (Modelagem e Crescimento microalgal).....	51
5.1.1. Relatório de citações	51
5.1.2. Análise Qualitativa do portfólio (Estado da arte)	57
5.2. Análise Bibliométrica (Estruvita como nutriente)	60
5.2.1. Relatório de citação	60
5.2.2. Análise Qualitativa do portfólio (Estado da arte)	63
5.3. Concentração celular inicial	64
5.4. Cultivo padrão	65
5.5. Determinação do crescimento celular por espectroscopia UV-vis.	68
5.6. Determinação do teor de bio-óleo por infravermelho	69
5.7. Análise das condições de luminosidade no crescimento microalgal. ..	72

5.7.1. Abordagem Experimental	72
5.7.2. Modelagem matemática.....	74
5.7.3. Teores de bio-óleo	78
5.7.4. Redução de gastos energéticos com luminosidade no cultivo microalgal.....	80
5.8. Análise do uso de estruvita como nutriente.....	80
5.8.1. Curva de crescimento, parâmetros e teores de bio-óleo	81
5.8.2. Análise do Planejamento experimental	84
5.8.3. Redução de gastos com nutrientes no cultivo microalgal	90
5.9. Separação da biomassa e extração do bio-óleo via Soxhlet.....	91
6. CONCLUSÃO.....	94
7. SUGESTÕES FUTURAS	95
8. REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografias de <i>N. oculata</i> típicas representando (a) a morfologia; e (b) diferentes organelas. LD, gotícula lipídica; N, núcleo; ST, pilhas de de tilacóides; V, vacúolo.....	19
Figura 2 - Diagrama esquemático de fatores de crescimento de microalgas, incluindo fontes de energia, nutrientes e outros fatores (por exemplo, mistura, temperatura, pH).	28
Figura 3 - Diagrama esquemático de um sistema de algas de lagoa aberta mostrando a recirculação das algas cultivadas e da água.	29
Figura 4 - Esquema de uma lagoa de canal. O caldo de algas é introduzido após a roda de pás e completa um ciclo enquanto é mecanicamente aerado com CO ₂ . É colhido antes da roda de pás para iniciar o ciclo novamente.....	30
Figura 5 - Diagrama esquemático de um sistema fechado de microalgas com recirculação contínua de algas suspensas, dosagem de CO ₂ e irradiação de luz visível.	32
Figura 6 - Curva de crescimento de microalgas. a) Lag, onde ocorre a adaptação; b) Log, onde ocorre o crescimento exponencial; c) Fase de redução de crescimento ou transição d) Estacionária; e) Fase de declínio ou morte celular.	35
Figura 7 - Fluxograma do processo de seleção, refino e análise de materiais científicos.	39
Figura 8 – Imagem do sistema de cultivo múltiplo desenvolvido por nascimento (2018) no 5º dia de cultivo.....	42
Figura 9 - Quadrantes da Câmara de Neubauer.	43
Figura 10 - Quantidade de publicações por ano.....	53
Figura 11 - Número de citações por ano.	54
Figura 12 - Periódicos com suas respectivas quantidades de artigos publicados.	54
Figura 13 - Relação de países por publicações.	55
Figura 14 - Mapa do Google Earth gerado pelo CiteSpace.....	56
Figura 15 - Mapa do Google Earth gerado pelo CiteSpace.....	56
Figura 16 - Quantidade de publicações por ano.....	62

Figura 17 - Número de citações por ano.	62
Figura 18 - Relação de países por publicações.	63
Figura 19 - Fotografia de amostra no 21 ^o dia de cultivo.	65
Figura 20 - Varredura de comprimento de onda realizada no experimento 03, dias 0 a 25.	66
Figura 21 - Curva de crescimento de <i>Nannochloropsis oculata</i> em relação a densidade celular.	66
Figura 22 - Curva de crescimento de <i>Nannochloropsis oculata</i> em relação a absorbância.	67
Figura 23 - Tempo de cultivo em função do pH.	67
Figura 24 - Curva de calibração (padrão) de crescimento de <i>Nannochloropsis oculata</i>	69
Figura 25 - Espectros no infravermelho do KBr puro e teores de bio-óleo (0%, 45% e 50%).	70
Figura 26 - Correlação linear do teor de bio-óleo com sinais FTIR (2930 cm ⁻¹ /1550 cm ⁻¹).	71
Figura 27 - Tempo de cultivo em função do pH para cada condição de luminosidade.	72
Figura 28 - Curva de crescimento experimental para cada condição de luminosidade estudada.	73
Figura 29 - Curvas de crescimento modeladas, Condição 01.	75
Figura 30 - Curvas de crescimento modeladas, Condição 02.	75
Figura 31 - Curvas de crescimento modeladas, Condição 03.	76
Figura 32 - Curvas de crescimento modeladas para C.01, C.02 e C.03.	77
Figura 33 - Tempo de cultivo em função do pH para os ensaios do planejamento experimental.	81
Figura 34 - Curva de crescimento experimental para cada ensaio.	82
Figura 35 - Cultivos do planejamento experimental, 19 ^o dia de cultivo. Numeração conforme Tabela 4.	83
Figura 36 – Variável resposta DMC. Probabilidade normal dos resíduos à esquerda e distribuição dos resíduos à direita.	87
Figura 37 - Variável resposta Teor de bio-óleo. Probabilidade normal dos resíduos à esquerda e distribuição dos resíduos à direita.	87
Figura 38 - Superfície de resposta: Estruvita x Nitrato para Teor de Bio-óleo.	88

Figura 39 - Superfície de resposta: Estruvita x Fosfato para Teor de Bio-óleo.	88
Figura 40 - Superfície de resposta: Fosfato x Nitrato para Teor de Bio-óleo. ..	89
Figura 41 - Fluxograma de utilização de estruvita.....	90
Figura 42 - Biomassa filtrada a vácuo à esquerda. Extração Soxhlet à direita.	91
Figura 43 - Espectro ATR-FTIR da amostra de bio-óleo obtido. Cultivo utilizando-se estruvita.....	92
Figura 44 - Espectro FTIR das amostras do bio-óleo via base úmida (vermelho) e seca (preto) extraído via Soxhlet com hexano. Cultivo utilizando-se fosfato.	92
Figura 45 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Gompertz, Condição 01.....	112
Figura 46 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Gompertz, Condição 02.....	112
Figura 47 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Gompertz, Condição 03.....	113
Figura 48 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Çelekli, Condição 01.....	113
Figura 49 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Çelekli, Condição 02.....	114
Figura 50 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Çelekli, Condição 03.....	114
Figura 51 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Stephanopoulos, Condição 01.....	115
Figura 52 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Stephanopoulos, Condição 02.....	115
Figura 53 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Stephanopoulos, Condição 03.....	116
Figura 54 - Superfície de resposta: Estruvita x Nitrato para DMC.....	116
Figura 55 - Superfície de resposta: Estruvita x Fosfato para DMC.....	117
Figura 56 - Superfície de resposta: Fosfato x Nitrato para DMC.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo lipídico e produtividade de diferentes espécies de microalgas (% em peso seco de biomassa).....	20
Tabela 2 - Concentração dos componentes da solução de fosfato, nitrato e silicato.	41
Tabela 3 - Fatores do planejamento fatorial 2^3	49
Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3	49
Tabela 5 - Relação dos artigos com número de citações por ano.....	52
Tabela 6 - Matriz SWOT.....	59
Tabela 7 - Relação dos artigos com número de citações por ano.....	61
Tabela 8 - Valores médios dos parâmetros de crescimento.....	68
Tabela 9 - Parâmetros de crescimento experimentais para condições de luminosidade.	73
Tabela 10 - Valores obtidos através do ajuste e modelagem.....	76
Tabela 11 - Parâmetros de crescimento modelados para condições de luminosidade.	78
Tabela 12 - Teores de bio-óleo e razão obtidos por FTIR.....	79
Tabela 13 - Comparação de gastos entre cultivos estudados e condição de controle.	80
Tabela 14 - Parâmetros de crescimento experimentais, teores de bio-óleo e razão por FTIR.	82
Tabela 15 - Planejamento de experimental 2^3	84
Tabela 16 - Tabela de Efeitos.	85
Tabela 17 - Equação do modelo matemático.	86
Tabela 18 - Teor de bio-óleo. Comparação entre extração e FTIR.	93
Tabela 19 - Cálculo do rendimento do bio-óleo obtido pela extração.....	117

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Parâmetro do modelo de Stephanopoulos;
a	Parâmetro do modelo de Çelekli;
ABS	Absorbância medida em UV-vis;
B	Parâmetro do modelo de Stephanopoulos;
b	Parâmetro do modelo de Çelekli;
C	Condição de Luminosidade;
c	Parâmetro do modelo de Çelekli;
d	Parâmetro do modelo de Çelekli;
DMC	Densidade máxima celular;
E	Concentração de estruvita;
e	Parâmetro do modelo de Çelekli;
F	Concentração de fosfato;
f	Parâmetro do modelo de Çelekli;
N	Concentração de nitrato;
$SFTIR$	Sinal das razões de picos em infravermelho (FTIR);
T	Teor de bio-óleo;
t	Tempo de cultivo;
t_m	Tempo morto;
U	Parâmetro do modelo de Gompertz;
X	Concentração celular final;
X_0	Concentração celular inicial;
W	Parâmetro do modelo de Gompertz;
y	Concentração de biomassa microalgal modelada;
y_0	Concentração celular inicial, da equação do modelo de Stephanopoulos;
μ	Constante de taxa de crescimento específica;

1. INTRODUÇÃO

Atualmente há uma enorme procura mundial por fontes energéticas sustentáveis. Justificada pelos grandes impactos ambientais gerados pelo consumo das fontes atuais de energia, principalmente combustíveis fósseis. Por exemplo, a crescente concentração de CO₂ atmosférico é considerada a principal razão para o aquecimento global e pode ter consequências catastróficas para o meio ambiente (CHANG et al., 2016).

As microalgas recebem assim uma atenção no âmbito das energias renováveis, pois usam fótons como fonte de energia para fixar dióxido de carbono (CO₂), reduzindo-o do ar atmosférico. Também, seu elevado rendimento fotossintético, comparado com plantas terrestres, conduz a grandes produções de biomassa microalgal. Essa biomassa pode atingir um teor lipídico alto (60% do peso seco sob certas condições de estresse).

Um benefício adicional é que as microalgas podem ser cultivadas em tanques sob solos áridos, impróprios para a agricultura convencional, ou em grandes reservatórios de água salgada. Além disso, a possibilidade de utilização de nutrientes de efluentes líquidos e a fixação de CO₂ podem gerar benefícios ambientais, ocasionados pela diminuição do impacto destes elementos nos ecossistemas locais (CONVERTI et al., 2009). Assim, a partir dessas possibilidades citadas, levaram pesquisadores a considerá-las como uma das principais fontes de biocombustíveis em um futuro próximo (BERNARD, 2011).

Entretanto, embora os biocombustíveis ainda sejam mais caros que os combustíveis fósseis, sua produção está aumentando em certos países do mundo todo, incentivada principalmente por medidas provenientes do poder público. Ainda existem muitos desafios tecnológicos a serem superados, para que o bio-óleo produzido através de microalgas alcance valores competitivos no mercado, principalmente com a redução de custos nas etapas de cultivo e extração de lipídios (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

1.1. Problema de pesquisa

O objeto de estudo desta pesquisa versa sobre métodos de predição e redução de gastos no cultivo de microalgas de modo a tornar o bio-óleo com valores mais competitivos de mercado. As dúvidas a serem sanadas compreendem se é possível a utilização de modelos matemáticos de luminosidade para predição do cultivo de microalgas? Pode-se reduzir gastos com luminosidade sem gerar grande interferência no cultivo? Também, pode ser considerado viável o uso de estruvita como fonte alternativa de nutrientes para cultivo de microalgas?

1.2. Justificativa

Para aumentar a eficiência produtiva é imprescindível manter as microalgas sob condições de cultivo otimizadas, e a este respeito, é necessário dispor de modelos cinéticos de crescimento microalgal, que sejam capazes de elucidar quantitativamente as influências de parâmetros operacionais cruciais, por exemplo, intensidade luminosa, taxa de arejamento, concentração de CO₂ (CHANG et al., 2016).

Portanto, o desenvolvimento e aplicação de modelos matemáticos que levem em conta os efeitos conjugados de intensidade de luz e concentração de nutrientes é necessário para alcançar uma otimização das condições de cultivo, voltadas para o crescimento microalgal máximo e biofixação de CO₂ (CHANG et al., 2016).

Além disso, o cultivo de microalgas adquire altos custos na adição de nutrientes, como fertilizantes comerciais, assim reduções significativas poderiam ser obtidas a partir de microalgas, se os nutrientes utilizados forem obtidos de forma mais acessível financeiramente (MOED; LEE; CHANG, 2015). Por exemplo, pode ser citado a alimentação direta com águas residuais, porém essa aplicação deve ser utilizada com cautela devido a possibilidade de introduzir no sistema microrganismos prejudiciais ao cultivo.

Desta forma, surge a possibilidade de utilização da precipitação de estruvita, de um efluente industrial, no lugar de águas residuais, como fonte de nitrogênio e fosfato (MOED; LEE; CHANG, 2015). Corroborando, Moed, Lee e Chang (2015) relatam que existem poucos estudos publicados sobre o uso de estruvita como fonte de nutrientes em cultivo de microalgas, justificando assim a importância deste estudo, de modo a contribuir com o preenchimento desta lacuna no meio científico e empresarial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Tendo em vista a importância do tema relacionado a microalgas, em especial para geração de energia, este trabalho se dividiu em duas etapas principais.

Em um primeiro momento teve-se como objetivo a realização de um estudo bibliométrico, no qual pretendeu-se investigar se os temas de modelagem e uso de estruvita como nutriente para cultivo de microalgas encontravam-se relevantes no meio acadêmico.

Na segunda etapa objetivou-se utilizar estruvita, produto formado a partir da precipitação do íon amônio, fosfato e magnésio no cultivo de microalgas da espécie *Nannochloropsis oculata* como provável nutriente substituto de nitrogênio ou fósforo, e analisar a influência de diferentes condições de luminosidade no cultivo por meio dos ajustes de modelos matemáticos aos dados de crescimento microalgal.

2.2. Objetivos específicos

Visando atender ao objetivo geral, os seguintes pontos foram definidos como objetivos específicos:

- Realizar um estudo bibliométrico sobre modelagem de crescimento e o uso da estruvita como nutriente em um cultivo de microalgas;
- Realizar o cultivo de microalgas sob diferentes condições de luminosidade, comparando-se os dados experimentais do crescimento microalgal com ajuste de modelos matemáticos;
- Realizar os experimentos de cultivo de microalgas em duplicata, utilizando um planejamento fatorial do tipo 2^3 com ponto central;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Microalgas

As microalgas são microrganismos unicelulares fotossintéticas procarióticas ou eucarióticas, que podem crescer rapidamente e viver em condições adversas devido à sua estrutura celular. Exemplos de microrganismos procariotas são Cyanobacteria (*Cyanophyceae*) e eucariotas são, por exemplo, algas verdes (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*). As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes, não apenas aquáticos, mas também terrestres, representando uma grande variedade de espécies que vivem em uma ampla gama de condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Quanto a reprodução, elas se reproduzem usando a fotossíntese para converter energia solar em energia química, completando todo um ciclo de crescimento em poucos dias. Além disso, elas podem crescer praticamente em qualquer lugar, exigindo luz solar (em cultivos fototróficos) e alguns nutrientes simples, embora as taxas de crescimento possam ser aceleradas pela adição de nutrientes específicos e arejamento suficiente (A LOOK BACK AT THE U.S., 1998).

As microalgas podem fornecer matéria-prima para vários tipos diferentes de combustíveis renováveis, como biodiesel, metano, hidrogênio, etanol, entre outros. Além disso, elas têm taxas de crescimento e produtividade muito mais altas quando comparados a florestas convencionais, culturas agrícolas e outras plantas aquáticas, exigindo muito menos área de terra do que outras matérias-primas de biodiesel de origem agrícola, portanto, a competição por solo arável com outras culturas, em particular para consumo humano, é bastante reduzida (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

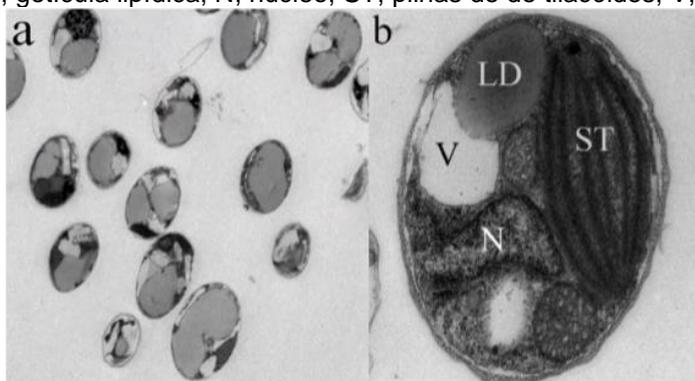
A biossíntese de lipídios através de microalgas é afetada por fatores químicos e físicos. Como fatores pode-se citar a disponibilidade de nutrientes, a salinidade, o pH do meio de cultura, a intensidade luminosa e a temperatura (AZEREDO, 2012).

Assim, as microalgas possuem características muito atrativas do ponto de vista produtivo, socioeconômico e ambiental. Porém para se obter o êxito com uma alta produtividade de lipídios, faz-se necessário a escolha de espécies com propriedades relevantes e de fácil cultivo (MCGINNIS; DEMPSTER; SOMMERFELD, 1997).

3.2. *Nannochloropsis oculata*

A microalga *Nannochloropsis oculata* pertence à divisão *Ochrophyta*, da classe *Eustigmatophyceae*. Possui célula simples em morfologia, com diâmetros variando de 2 a 8 μm e possui plastídeos semelhantes a plantas. Através da Figura 1 é possível visualizar a morfologia das células e a localização do armazenamento lipídico (MA et al., 2016).

Figura 1 - Micrografias de *N. oculata* típicas representando (a) a morfologia; e (b) diferentes organelas. LD, gotícula lipídica; N, núcleo; ST, pilhas de de tilacóides; V, vacúolo.



Fonte: (MA et al., 2016).

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* tem atraído cada vez mais o interesse de pesquisadores devido sua alta taxa de acumulação de biomassa e alto teor de lipídios. Sua composição química consiste em 17,62% de lipídios, 10,62% de carboidratos e 32,76% de proteínas (MAL et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

Sob condições ótimas de crescimento, essa espécie de microalga sintetiza ácidos graxos principalmente para a esterificação em lipídios de membrana à base de glicerol, que constituem cerca de 5% a 20% do peso seco da célula (DW); sob condições desfavoráveis ou estressadas, a biossíntese de lipídios de microalgas é canalizada para lipídios neutros principalmente na forma de TAGs (20% -50% DW). As *Nannochloropsis* têm um conteúdo lipídico que varia de 37% a 60% (de DW), maior do que outras cepas de microalgas, indicando a superioridade da espécie para produção lipídica (MA et al., 2016).

A *Nannochloropsis oculata* possui parede celular rígida e composta de polissacarídeos; a estrutura química do seu produto de reserva não é conhecida, mas sabe-se que não se trata do amido. Por sua facilidade de cultivo, tamanho pequeno, velocidade de crescimento e alto teor de lipídios (Tabela 1), esta microalga é uma

promissora matéria prima para a obtenção de biodiesel (ZITELLI, RODOLFI & TREDECI, 2004; LOURENÇO, 2006; SOARES, 2010; DOAN, 2011; MOAZAMI, 2012).

Tabela 1 - Conteúdo lipídico e produtividade de diferentes espécies de microalgas (% em peso seco de biomassa).

Espécie	Percentual Lipídios %	Produtividade		
		De Lipídios mg/L/dia	Volumétrica g/L/dia	Espacial g/m ² /dia
Botryococcus braunii	25-75	-	0.02	3.0
Chaetoceros muelleri	34	22	0.07	-
Chaetoceros calcitrans	15-40	18	0.04	-
Chlorella vulgaris	5-58	11-40	0.02-0.20	0.57-0.95
Chlorella sp.	10-48	42	0.02-2.5	1.61–16.47/25
Dunaliella salina	6-25	116	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
Dunaliella primolecta	23	-	0.09	14
Dunaliella tertiolecta	17-71	-	0.12	-
Dunaliella sp.	18-67	34	-	-
Euglena gracilis	14-20	-	7.70	-
Isochysis galbana	7-40	-	0.32–1.60	-
Isochysis sp.	7-33	38	0.08–0.17	-
Nannochloropsis o.	23-29	84-142	0.37–0.48	-
Nannochloropsis sp.	12-53	37-90	0.17–1.43	1.9–5.3
Pavlova salina	31	49	0.16	-
Pavlova lutheri	35	40	0.14	-
Scenedesmus Dimorphus	19-21	41-54	0.03–0.26	2.43–13.52
Spirulina platensis	4-16	-	0.06–4.3	1.5 14.5/24–51
Spirulina maxima	4-9	-	0.21–0.25	25
Tetraselmis suecica	8-23	27-36	0.12–0.32	19
Tetraselmis sp.	12-15	43	0.30	-

Fonte: CHISTI 2007; MENG et al., 2009; RODOLFI et al., 2009; MATA et al., 2010.

3.3. Meios de cultivo microalgal

As microalgas podem ser cultivadas em meios de cultivo marinho, água doce e salobra. Os meios de cultivo são compostos por vitaminas e nutrientes, estes nutrientes são compostos por macronutrientes e micronutrientes (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

A composição dos meios de cultivo varia de acordo com a espécie, pois cada tipo de microalga possui necessidade diversa. Como exemplo, o silicato é usado especificamente para o crescimento das diatomáceas que utilizam este composto para a formação de uma carapaça externa, chamada de frústula (COUTTEAU, 1996).

De acordo com a composição química os meios de cultivos podem ser classificados como semidefinidos e definidos. Os meios de cultivo semidefinidos são preparados com água do mar natural suplementada com nutrientes e vitaminas. Os meios de cultivo definidos são preparados a partir de água, deionizada ou destilada, suplementada com nutrientes, vitaminas e sais inorgânicos, a fim de simular a composição da água do mar. Os meios de cultivo semidefinidos são os mais utilizados para a produção de microalgas marinhas em escala comercial (GUILLARD, 1975; LOURENÇO, 2006).

3.4. Tipos de cultivo microalgal

As características de crescimento e composição das microalgas são conhecidas por depender significativamente das condições de cultivo. Existem quatro tipos principais de condições de cultivo para microalgas: cultivo fototrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico, que estão apresentadas no Quadro 1 (CHEN et al., 2011).

Quadro 1 - Tipos de cultivo de microalgas.

Fototrófico	
Descrição	Ocorre quando as microalgas usam luz como fonte de energia, e carbono inorgânico (ex, CO ₂) como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese. É a condição de cultivo mais utilizada para o crescimento de microalgas.
Vantagens	Problemas de contaminação menos grave, sendo mais fácil de escalar, como um sistema de lagoas abertas, e é promissor porque as microalgas podem absorver CO ₂ do gás de combustão das fábricas e convertê-lo em óleo. O menor custo para o escalonamento do cultivo fototrófico, torna este método muito atraente.
Desvantagens	Produtividade do óleo geralmente mais baixa que a do cultivo heterotrófico, devido principalmente ao lento crescimento celular e à baixa produtividade de biomassa.
Heterotrófico	
Descrição	Microalgas usam carbono orgânico como fonte de energia e carbono, podendo assimilar uma variedade de fontes de carbono orgânico (como glicose, acetato, glicerol, frutose, sacarose, lactose, galactose e manose) para o crescimento.
Vantagens	Pode evitar os problemas associados à luz limitada que impedem a alta densidade celular em fotobiorreatores de larga escala durante o cultivo fototrófico, deste modo, maior produção de biomassa e produtividade podem ser obtidas.
Desvantagens	Contaminação, especialmente em sistemas abertos de cultivo, causando problemas na produção em grande escala. Além disso, o custo de uma fonte de carbono orgânico também é uma grande preocupação do aspecto comercial.
Mixotrófico	
Descrição	Ocorre quando as microalgas sofrem fotossíntese e usam compostos orgânicos e carbono inorgânico (CO ₂) como fonte de carbono para o crescimento. Isto significa que as microalgas são capazes de viver sob condições fototróficas ou heterotróficas, ou ambas.
Fotoheterotrófico	
Descrição	Ocorre quando as microalgas requerem luz quando se utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono. A principal diferença entre o cultivo mixotrófico e fotoheterotrófico é que, este último, requer luz como fonte de energia, enquanto o cultivo mixotrófico pode usar compostos orgânicos para atender a essa finalidade.
Mixotrófico e Fotoheterotrófico	
Vantagens	Promove maior produção de biomassa, dependendo da característica da microalga cultivada.
Desvantagens	São restritos pelo risco de contaminação e requisitos de luz, e também requerem projetos complexos de fotobiorreatores, aumentando assim o custo de operação.

Fonte: Adaptado de (LIANG et al., 2009; HUANG et al., 2010; MATA et al., 2010; CHEN et al., 2011; SUALI & SARBATLY, 2012; HAKALIN, 2014).

3.5. Fatores propícios para crescimento microalgal

Carbono, nitrogênio e fósforo são geralmente usados por microrganismos como fonte de alimento. Isso é necessário para a sustentabilidade de sua vida. Portanto, as microalgas também podem crescer usando esses tipos de substratos, além de condições favoráveis de temperatura, pH e luminosidade (RAZZAK et al., 2017).

3.5.1. Carbono

O carbono inorgânico pode ser usado como uma fonte de carbono sob condições fototróficas e mixotróficas. Além disso, o carbono orgânico encontrado nos nutrientes pode ser usado como fonte de carbono tanto para o crescimento das microalgas quanto para a energia necessária. O papel específico do carbono orgânico depende fortemente do metabolismo das microalgas. Esta capacidade das microalgas para usar carbono orgânico é relevante quando microalgas são cultivadas em águas residuais sob condições mixotróficas (OSUNDEKO; DAVIES; PITTMAN, 2013).

Perez-Garcia et al. (2011) revisaram o metabolismo de glicose, glicerol, acetato e outras fontes de carbono para o cultivo de microalgas heterotróficas. Esses autores mostraram a flexibilidade significativa de microalgas em relação a vários meios de fonte de carbono. Embora houvesse alta produtividade de biomassa sob condições mixotróficas, pôde-se notar também que houve menos captura de CO₂. No entanto, sob tais condições operacionais, tanto o carbono orgânico quanto o CO₂ são utilizados como parte do corpo celular. Esta competição por fontes de carbono pode reduzir, como resultado, a quantidade de CO₂ consumida pelas microalgas.

3.5.2. Nitrogênio

Compostos nitrogenados, especialmente amônio e nitrato, são importantes substratos para o crescimento de microalgas. Estes compostos contribuem para mais de 10% da biomassa de microalgas. Além disso, a ureia e o nitrito são outras formas de compostos nitrogenados, mas o último é considerado tóxico em altas concentrações. Em particular, o amônio é preferido pelas células de microalgas (CAI; PARK; LI, 2013).

No entanto, alguns pesquisadores afirmam que o amônio também pode ser tóxico para microalgas. Este é o caso, se o amônio estiver presente em altas concentrações. Além disso, a amônia também pode causar efeitos nocivos ao meio ambiente, se for liberada diretamente na atmosfera. Assim, uma seleção adequada de uma fonte de nitrogênio é necessária para o crescimento de microalgas. Pode-se notar também que, no caso do tratamento combinado de águas residuárias e cultura de microalgas, os nutrientes ou as fontes de nitrogênio podem ser difíceis de serem controlados (WANG et al., 2008).

As microalgas convertem compostos nitrogenados inorgânicos, como amônio, nitrato, nitrito, amônia, em compostos orgânicos contendo nitrogênio, como proteínas, enzimas e clorofilas, por meio de processos de assimilação (CAI; PARK; LI, 2013).

3.5.3. Fósforo

O fósforo é outro nutriente importante para o crescimento de microalgas. O fósforo pode participar na formação de proteínas, lipídios e intermediários de carboidratos. Da mesma forma, as microalgas podem incorporar compostos fosfatados inorgânicos, como os fosfatos de hidrogênio formando espécies orgânicas via fosforilação. Além disso, algumas microalgas são capazes de utilizar fósforo, formando ésteres orgânicos que são valiosos para o crescimento celular. Em um meio de pH relativamente alto, os fosfatos sedimentam na forma de sais fosfóricos e matéria orgânica (HU et al., 2012; CAI; PARK; LI, 2013).

As células de microalgas tendem a armazenar as quantidades em excesso de fósforo como grânulos de polifosfato. Assim, estes grânulos podem ser usadas por microalgas durante condições de fome de fosfato para o crescimento celular. Como resultado, a redução de fosfatos pode afetar o processo de fotossíntese e a produção de lipídios (RAZZAK et al., 2017).

3.5.4. Outros micronutrientes / elementos

Outros micronutrientes como metais traços, como silício e ferro, podem ser usados pela cultura de microalgas. Essas espécies podem ser tóxicas para algumas espécies de microalgas, em concentrações razoavelmente altas (CAI; PARK; LI, 2013).

3.5.5. Concentração e absorção de CO₂

O dióxido de carbono é usado principalmente como fonte de carbono para o cultivo de microalgas fotoautotróficas. Nos últimos anos, muitos pesquisadores estudaram o efeito da concentração de CO₂ no crescimento de células de microalgas a partir de um ponto de vista fisiológico (RAZZAK et al., 2017).

O ar atmosférico contém pequenas quantidades de CO₂. Este CO₂ não é suficiente para o crescimento de células de microalgas devido às limitadas forças de transferência de massa. Este problema pode ser resolvido tomando CO₂ de uma fonte pura ou usando CO₂ dos gases de combustão, resolvendo ao mesmo tempo a questão ambiental com a captura de CO₂. Além disso, quando um fluxo de CO₂ é alimentado para o meio de cultura com aspersores, a formação de grandes bolhas reduz a eficiência da utilização de CO₂. Portanto, pequenos fluxos de bolhas precisam ser implementados para melhor absorção de CO₂ (MCGINN et al., 2011; FERNÁNDEZ et al., 2012).

Foi observado por Tang et al. (2011) que a produção de biomassa pode estar relacionada com as concentrações de CO₂. Sendo que sua produção pode aumentar quando baixas concentrações de CO₂ são utilizadas. Por outro lado, o rendimento da biomassa começa a diminuir em concentrações mais elevadas de CO₂. Esses autores identificaram 5 a 10% de CO₂ como faixa de concentração ótima para o crescimento de microalgas.

Chiu et al. (2009) estudaram o crescimento de *Nannochloropsis oculata* em uma cultura semicontínua. Os resultados mostram que quando o ar com 2% (v / v) de CO₂ é alimentado ao meio de cultura, o crescimento das células de microalgas é estimulado. Se, no entanto, concentrações mais altas de CO₂ são usadas no meio de cultura (5–15 v%), isso tem efeitos negativos sobre o crescimento celular.

3.5.6. Luminosidade

A disponibilidade e quantidade de luz é um fator importante do processo de fotossíntese no crescimento das microalgas. A este respeito, pode-se mencionar que existem muitos parâmetros que afetam a eficiência da utilização da luz, como a densidade da cultura e a pigmentação celular (RUBIO et al., 2002).

Em sistemas de cultivo abertos, a luz solar é aplicada diretamente aos meios de cultura. Assim, em sistemas ao ar livre, pode-se notar que, às vezes, há limitações de crescimento, dado que a radiação de luz é baixa e distribuída de forma desigual. Por outro lado, em sistemas fechados, os fotobiorreatores podem fornecer uma taxa de crescimento de microalgas muito maior usando lâmpadas fluorescentes (RAZZAK et al., 2017).

Rubio et al. (2002) desenvolveram um modelo para descrever os efeitos da radiação de luz no processo de fotossíntese do crescimento de microalgas. Observou-se que para atingir alta produção lipídica, a utilização de luz deve ser aprimorada para melhorar a eficiência fotossintética.

O aumento da intensidade de luz causa o aumento de produção da biomassa até um determinado nível. A partir de um determinado ponto, os fotossistemas são danificados e a produção de biomassa diminui, sendo que estes danos são definidos como fotoinibição. Portanto, é muito importante manter uma iluminação adequada durante todo período de cultivo ou utilizar a luz de forma eficiente, expondo as microalgas a pequenos períodos cíclicos de claro/escuro (RICHMOND, 2000; CAMACHO et al., 2003; ANDRADE et al., 2014).

3.5.7. Temperatura de cultivo

A temperatura tem efeitos perceptíveis no crescimento de microalgas e na produção de biomassa, porque afeta o processo metabólico e a taxa de reação biológica (RAZZAK et al., 2017).

Flutuações sazonais e diárias das condições climáticas dificultam o controle da temperatura dentro de uma faixa específica para o cultivo de microalgas ao ar livre. Isto é especialmente verdade, em dias mais frios, quando a temperatura relativamente baixa afeta o crescimento das microalgas. Este problema pode ser resolvido através do desenvolvimento de cultura de microalgas em conjunto com uma fonte de CO₂ relativamente quente. Por outro lado, nos dias de verão, quando a temperatura é muito alta, o resfriamento evaporativo pode ser usado para favorecer as melhores condições para a cultura de microalgas. Isto pode ser conseguido pulverizando a água no tanque de cultivo (MCGINN et al., 2011).

Os cultivos de laboratório têm a vantagem de permitir melhor controle de temperatura nos níveis térmicos desejados. Portanto, colocando o fotobiorreator em

uma sala especial com uma temperatura definida, o meio de microalgas pode ser mantido a uma temperatura definida (RAWAT et al., 2013).

A temperatura ideal depende de cada espécie a ser cultivada. Algumas microalgas são tolerantes a temperaturas elevadas, como as *Chlorellas*, que suportam até 315 K (42°C), mas geralmente são mantidas entre 298 e 308 K (25 e 35°C) (ANDRADE et al., 2014).

3.5.8.pH

O pH do meio de cultura é um fator importante que afeta o crescimento de algas. Este é o caso, uma vez que o pH inadequado (alto ou baixo) pode ter um impacto negativo no crescimento de células de microalgas. Normalmente, o meio ácido (pH 5–7) é favorável para o crescimento de algas eucarióticas de água doce, enquanto o meio alcalino (pH 7–9) é benéfico para o crescimento de cianobactérias (algas azuis-verdes) (RAZZAK et al., 2013).

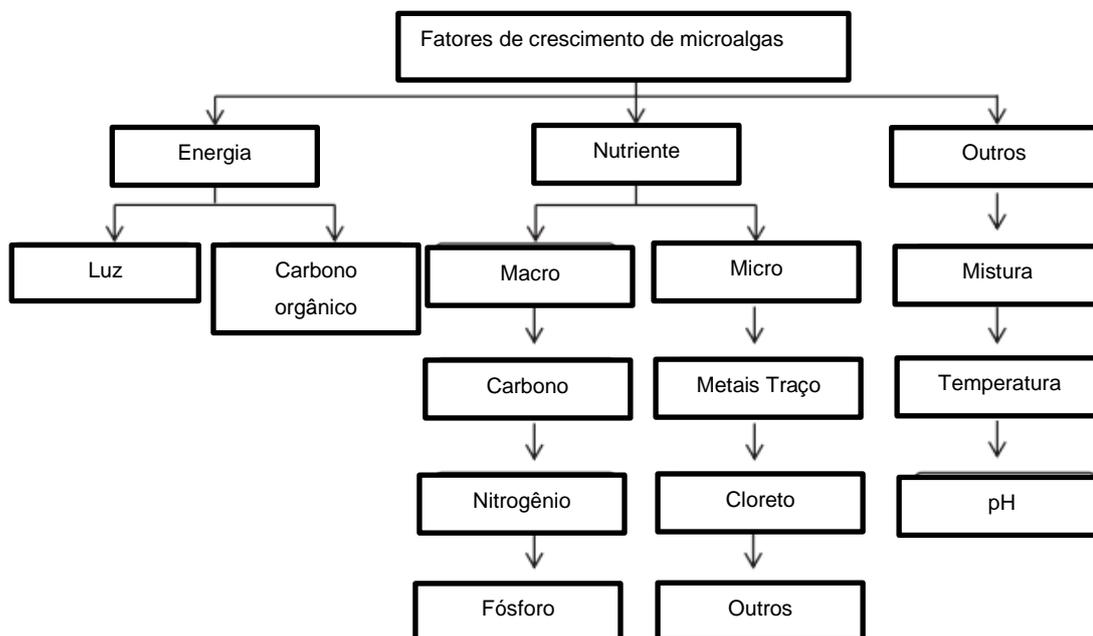
3.5.9.Efeito do fluxo de gás na mistura de culturas

Ar atmosférico livre misturado com CO₂ puro ou mesmo gases de combustão, pode ser alimentado a uma cultura de microalgas. Ao usar fluxos adequados, isso pode ajudar a evitar a precipitação celular, aumentando o crescimento celular (RAZZAK et al., 2017).

Devido à limitação do transporte de massa e difusão de CO₂ através do meio líquido, o aumento da taxa de fluxo de gás ajuda a maximizar a produtividade da biomassa. Descobriu-se que em muitos fotobiorreatores, o gás é introduzido para fornecer tanto turbulência quanto manter as células de microalgas em suspensão. De fato, a espessura da camada de água que envolve as células das microalgas determina a taxa de transferência ou utilização de nutrientes. Assim, uma vez que a turbulência é criada nos meios de cultura, taxas favoráveis de transferência de nutrientes são asseguradas (RAZZAK et al., 2017).

A Figura 2 apresenta uma visão esquemática dos fatores e condições abordadas que afetam o crescimento das microalgas.

Figura 2 - Diagrama esquemático de fatores de crescimento de microalgas, incluindo fontes de energia, nutrientes e outros fatores (por exemplo, mistura, temperatura, pH).



Fonte: Adaptado de RAZZAK et al. (2017).

3.6. Estruvita

O fosfato de amônio de magnésio hexa-hidratado, conhecido como estruvita (MgNH_4PO_4), é composto pelos íon de magnésio (Mg^{2+}), amônio (NH_4^+) e fosfato (PO_4^{3-}) em meio aquoso. Sua principal utilização é como fertilizante, e é produzida com o intuito de se remover nitrogênio e fósforo de águas residuais, por serem os nutrientes responsáveis pela eutrofização em lagos e rios (CHRISTOFFERSEN; KAAS, 2000).

A precipitação de estruvita pode remover tanto a amônia (NH_3) quanto o íon fosfato (PO_4^{3-}), dependendo da composição do efluente tratado. Deste modo, a estruvita se mostra como uma promissora fonte de nutrientes para cultivo de microalgas, uma vez que possui em sua composição química nitrogênio e fósforo, dois dos principais fatores de crescimento microalgal (GERHARDT; REISDORFER; CARDOSO, 2018b).

Para que a utilização da estruvita como nutriente microalgal seja viável do ponto de vista econômico, com o objetivo de redução de gastos com nutrientes sintéticos convencionais, tem-se como ideia principal aproveitar a estruvita estocada de um processo de precipitação de efluentes.

3.7. Sistemas de cultivo microalgal

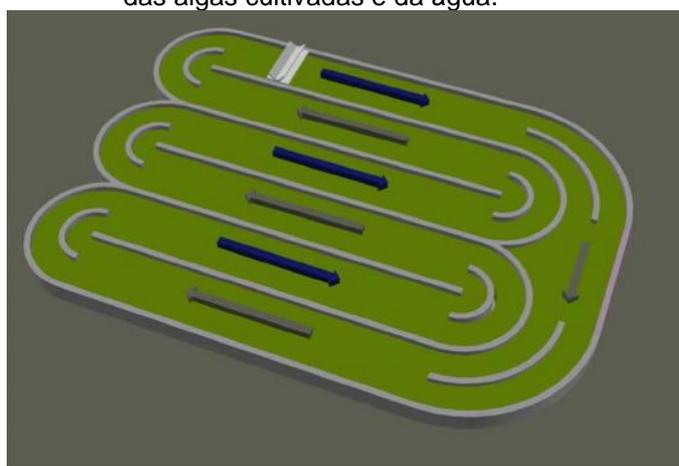
Atualmente, as microalgas são cultivadas em sistemas abertos ou em sistemas fechados (fotobiorreatores - PBRs). Esses dois tipos de sistema podem ter várias configurações. Em ambos os casos, as células de microalgas estão suspensas em meio de cultura líquido ou água, sendo este último o componente básico das culturas de microalgas (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

A seleção do sistema de cultivo de microalgas é a chave para a remoção eficiente de nutrientes e a produção efetiva de biomassa. Sistemas híbridos, que são uma combinação de um sistema aberto e um sistema fechado, podem ser usados para alcançar alta produtividade de biomassa com alta remoção de nutrientes (RAZZAK et al., 2017).

3.7.1. Sistemas abertos

O cultivo de microalgas em sistemas de produção em lagoas abertas tem sido usado desde a década de 1950. Esses sistemas podem ser categorizados em águas naturais, lagoas ou contêineres artificiais. As lagoas de pista são o sistema artificial mais usado (Figura 3) (BOROWITZKA, 1999; RAZZAK et al., 2017).

Figura 3 - Diagrama esquemático de um sistema de algas de lagoa aberta mostrando a recirculação das algas cultivadas e da água.

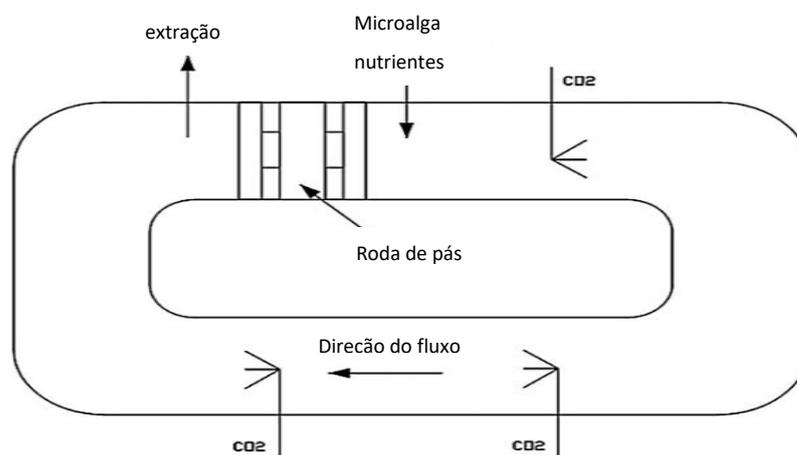


Fonte: (RAZZAK et al., 2017).

As lagoas de pista são tipicamente feitas de canais de recirculação em forma de loop fechado (Figura 4), geralmente entre 0,2 e 0,5 m de profundidade, com mistura e

circulação necessárias para estabilizar o crescimento e a produtividade das microalgas. As lagoas de pista são geralmente construídas em concreto, mas tanques compactos revestidos com plástico branco também têm sido usados. Em um ciclo de produção contínuo, o caldo de algas e os nutrientes são introduzidos na frente da roda de pás e circulados através do circuito até o ponto de extração da colheita. A roda de pás está em operação contínua para evitar a sedimentação. O requisito de CO_2 da microalga é normalmente satisfeito a partir do ar da superfície, mas podem ser instalados aeradores submersos para aumentar a absorção de CO_2 (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Figura 4 - Esquema de uma lagoa de canal. O caldo de algas é introduzido após a roda de pás e completa um ciclo enquanto é mecanicamente aerado com CO_2 . É colhido antes da roda de pás para iniciar o ciclo novamente.



Fonte: Adaptado de BRENNAN; OWENDE (2010).

Em comparação com os fotobiorreatores fechados, a lagoa aberta é o método mais barato de produção de biomassa de algas em larga escala. A produção de lagos abertos não compete necessariamente pela terra com as culturas agrícolas existentes, uma vez que podem ser implementadas em áreas com um potencial marginal de produção agrícola. Eles também têm menor necessidade de entrada de energia, manutenção e limpeza regulares são mais fáceis e, portanto, podem ter o potencial de retornar uma grande produção líquida de energia (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Os sistemas abertos de cultivo estão expostos a variações nas condições meteorológicas. Flutuações sazonais do tempo podem afetar a intensidade da luz e a temperatura. Quantidades consideráveis de água evaporam resultando em uma redução da água a ser tratada. Além disso, o nível de água deve ser mantido muito

baixo, para permitir que a luz solar atinja todas as microalgas que estão sendo cultivadas (RAZZAK et al., 2017).

Em um sistema aberto, outros contaminantes ou outros microrganismos podem competir com as microalgas por seus alimentos. Estes microrganismos competidores podem limitar o crescimento de algas. Assim, em sistemas abertos, as microalgas podem crescer sob condições desfavoráveis e, como resultado, muito poucos tipos de espécies de microalgas são adequados para sistemas abertos (HARUN et al., 2010).

Em relação à produtividade da biomassa, os sistemas de lagoas abertas são menos eficientes quando comparados aos fotobiorreatores fechados. Isso pode ser atribuído a vários fatores determinantes, incluindo perdas por evaporação, flutuação de temperatura no meio de crescimento, deficiências de CO₂, mistura ineficiente e limitação de luz (CHISTI, 2007).

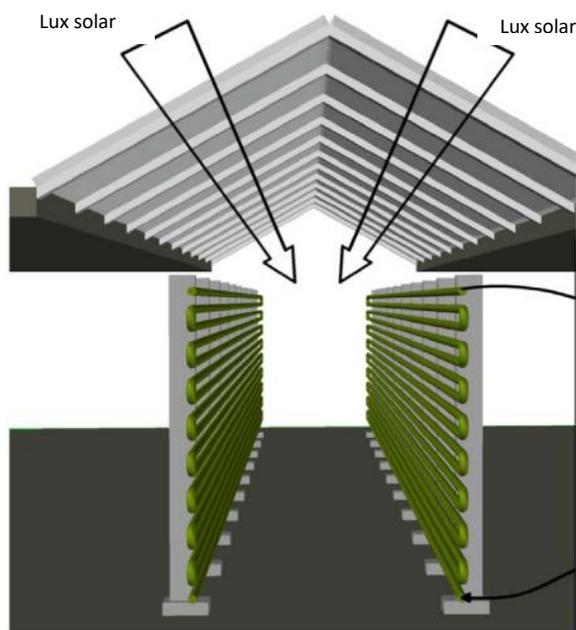
3.7.2. *Sistemas fechados*

Nos sistemas fechados, designados como fotobiorreatores (PBRs), as condições de crescimento são bem controladas. Além disso, o cultivo de uma única espécie também pode ocorrer. Como os fotobiorreatores resolvem muitos problemas do cultivo aberto, os pesquisadores se concentraram em projetar fotobiorreatores para a grande produção de biomassa de microalgas. Geralmente, esses reatores são projetados para aumentar a acessibilidade à luz. Eles também permitem a mistura perfeita, para permitir que a luz esteja dentro de um valor ótimo para o crescimento celular e para melhorar as trocas gasosas (RAZZAK et al., 2017).

Os fotobiorreatores podem ser agrupados com base em sua geometria ou dependendo do material usado para sua construção. Fotobiorreatores podem ser construídos como sacos, tanques, torres, placas ou ter forma tubular. Os materiais de construção podem ser de vidro ou plástico (CHAUMONT, 1993; SING et al., 2011).

Os fotobiorreatores tubulares parecem ser os mais adequados. A Figura 5 descreve o sistema de fotobiorreator com uma bomba utilizada para recircular o meio de suspensão (água e algas). Um tanque auxiliar é usado para separar o oxigênio produzido da fotossíntese. Isso é importante, dado que o excesso de oxigênio pode afetar negativamente o crescimento das microalgas. O tanque auxiliar também é usado para saturar a solução pastosa com CO₂ (RAZZAK et al., 2017).

Figura 5 - Diagrama esquemático de um sistema fechado de microalgas com recirculação contínua de algas suspensas, dosagem de CO₂ e irradiação de luz visível.



Fonte: Adaptado de RAZZAK et al. (2017).

Os sistemas fechados oferecem uma melhor e efetiva utilização da luz, o que reflete positivamente na produção de biomassa. Devido à ausência de outros microrganismos contaminantes, os fotobiorreatores fechados são capazes de conter vários tipos de espécies de microalgas e podem ser operados sob diferentes condições climáticas. Fotobiorreatores também reduzem as perdas de CO₂, uma vez que o fluxo de gás e a mistura podem ser regulados sem dificuldade. Além disso, a temperatura pode ser ajustada para um valor desejado colocando o reator em uma sala especial com temperatura controlada. Isto é favorável, dada a dificuldade de controlar a temperatura de cultivo ao ar livre (RINKEVICH, 1999; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; RAWAT et al., 2013).

Os fotobiorreatores fechados, diferem em seu custo e em outros requisitos operacionais, sendo difícil compará-los, porém são geralmente mais caros que os sistemas abertos. Outra desvantagem, é a ocorrência de incrustação biológica, em que algumas algas podem crescer e aderir às paredes do reator, diminuindo a acessibilidade da luz à cultura e, portanto, levando a uma redução na produtividade da biomassa (CHISTI, 2007; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

3.7.3. *Sistemas de fotobiorreatores híbridos*

Os sistemas híbridos superam as limitações dos sistemas abertos e o alto custo inicial e operacional associado aos sistemas fechados. Esses sistemas são econômicos e podem ser usados para o cultivo em larga escala de algas. Neste caso, as microalgas são primeiro cultivadas num fotobiorreator, para obter inoculantes de alta densidade. A microalga é então transferida para um sistema aberto, ajudando a alcançar uma produção ótima de biomassa (SCHENK et al., 2008; SING et al., 2011).

Além disso, a contaminação em sistemas abertos é consideravelmente reduzida. De fato, quando transferida para o sistema aberto, as microalgas tornam-se imediatamente as espécies dominantes competindo de forma muito eficaz com outros microrganismos (CAI; PARK; LI, 2013).

3.8. Regimes de cultivo de microalgas

3.8.1. *Batelada*

No cultivo em batelada, as células de microalgas são inoculadas a um meio de cultivo com uma concentração pré-definida de nutrientes. Iniciado o cultivo não ocorre adição posterior de nutrientes ou células a cultura, e é apenas encerrado quando se esgotam os nutrientes, ou o produto de interesse tenha sido produzido. O cultivo possui um tempo determinado e existe uma variação da concentração de biomassa algal. Este tipo de cultivo é caracterizado pela curva de crescimento de microalgas, com fases distintas e definidas de crescimento (COUTTEAU, 1996).

A grande vantagem deste tipo de cultivo é em relação a simplicidade e versatilidade do biorreator, sendo possível alterar as condições de crescimento com o intuito de obter diversos resultados. Por outro lado, como desvantagens tem-se a baixa eficiência, tempos mortos (preparo do biorreator, esterilização e preparo de inóculo) e o efeito do “auto sombreamento”, que ocorre devido ao aumento da densidade celular dificultando a penetração de luz (LOURENÇO, 2006).

Os cultivos em batelada podem ser utilizados em pesquisas e em cultivos comerciais. Como exemplo de aplicações em pesquisa, pode-se mencionar a elucidação das transformações químicas sofridas pelas microalgas ao longo do desenvolvimento, nas diferentes fases de cultivo.

Lourenço *et al.* (2004) avaliaram a alteração da composição química, de 12 espécies de microalgas marinhas, em cultivo batelada. Os resultados mostraram que a razão atômica de carbono:nitrogênio (C:N) nas células aumentou ao longo do desenvolvimento dos cultivos. Os autores concluíram que proteínas e nitrogênio total são mais abundantes nas células na fase exponencial de crescimento, quando os nutrientes do meio de cultura são fartos; porém, as concentrações de proteínas e de nitrogênio diminuem na fase estacionária de crescimento.

3.8.2. *Semicontínuo*

O processo semicontínuo é caracterizado quando ocorre a retirada parcial do meio de cultivo de microalgas e a reposição por um meio de cultura sem células. Esse procedimento é normalmente realizado quando as microalgas ainda estão na fase exponencial de crescimento. Neste tipo de cultivo, a composição química das células tende a sofrer poucas alterações ao longo do tempo (pois elas permanecem em condições de crescimento sem fatores limitantes) (BORZANI, 2001).

A repetição das diluições em dias consecutivos permite remover grande biomassa de alga diariamente. Teoricamente este processo pode ser operado indefinidamente, o que torna os cultivos semicontínuos muito produtivos e uma das melhores formas de obter biomassa constantemente (LOURENÇO, 2006).

A manipulação frequente da cultura, ocasionada pelas diluições sucessivas, pode acarretar problemas de contaminação. Em laboratórios isso pode ser algo muito desfavorável. Além da contaminação, células velhas permanecem no meio de cultivo, assim como as substâncias excretadas pelas células já existentes. Essas características comprometem a eficiência e produtividade do cultivo, sendo mais favorável o reinício do cultivo do que a manutenção prolongada do ciclo (BORZANI, 2001).

3.8.3. *Contínuo*

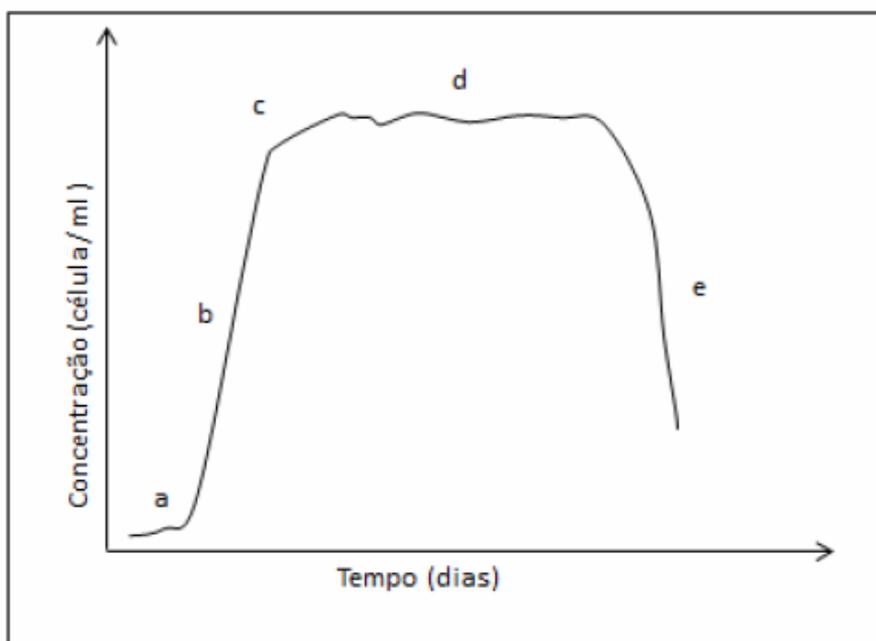
Neste regime de cultivo, um fluxo constante de cultura microalgal é removido do biorreator simultaneamente com a entrada de meio de cultivo fresco. As taxas de crescimento são reguladas e a densidade celular é controlada automaticamente por sensores óticos. A concentração de células e nutrientes é mantida constante e o

cultivo atinge estado estacionário. O cultivo pode permanecer em estado estacionário por um período prolongado, conseqüentemente, são produzidas grandes quantidades de células de alta qualidade e homogeneidade (MATA; MARTINS; CAETANO,2009).

O cultivo contínuo não pode permanecer operando por longo período de tempo, podendo haver contaminação de outros microrganismos, assim como no cultivo semicontínuo. O cultivo contínuo possui ainda um custo elevado devido à necessidade de automação e condições de temperatura e iluminação constantes (MATA; MARTINS; CAETANO, 2009).

3.9. Curva de crescimento de microalgas

Figura 6 - Curva de crescimento de microalgas. a) Lag, onde ocorre a adaptação; b) Log, onde ocorre o crescimento exponencial; c) Fase de redução de crescimento ou transição d) Estacionária; e) Fase de declínio ou morte celular.



Fonte: (MAIER, 2009).

Tipicamente, para entender e definir o crescimento de microalgas, as células são colocadas em um meio líquido no qual os nutrientes e as condições ambientais são controladas. Se o meio fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento e os parâmetros ambientais forem ideais, o aumento no número de células ou na concentração de biomassa pode ser medido como uma função do tempo para se obter uma curva de crescimento. Várias fases de crescimento distintas podem ser observadas dentro de uma curva de crescimento (Figura 6). Cada uma dessas fases

representa um período distinto de crescimento que está associado a mudanças fisiológicas típicas na cultura de células (Quadro 2) (MAIER, 2009).

Quadro 2 - Fases da curva de crescimento de microalgas.

Fases	Descrição	Taxa de crescimento
Fase Lag	É devida à adaptação fisiológica da célula às condições de cultura. Isso pode envolver um requisito de tempo para indução de mensageiro específico e síntese de proteínas para atender aos requisitos da nova cultura. Geralmente dura de minutos a várias horas.	Essencialmente zero
Fase Exponencial	É caracterizada por um período de crescimento exponencial, o mais rápido crescimento possível sob as condições presentes no sistema de cultura.	Descrita pelas equações (1), (2), (3) e (4). O número de células aumenta na progressão geométrica até que, após n divisões, o número de células seja 2^n . Se o número inicial da célula for X_0 , o número de células após n duplicações é $2^n X_0$.
Fase Estacionária	Existem várias razões pelas quais uma cultura pode alcançar fase estacionária. Uma razão comum é que a fonte de energia ou um nutriente essencial torna-se completamente usado. Quando uma fonte de carbono é usada, não significa necessariamente que todo o crescimento para, pois as células mortas podem lisar e fornecer uma fonte de nutrientes. Assim, em muitas curvas de crescimento, a fase estacionária realmente mostra uma pequena quantidade de crescimento. Uma segunda razão pela qual a fase estacionária pode ser observada é que os resíduos se acumulam até o ponto em que começam a inibir o crescimento celular ou são tóxicos para as células. As concentrações de carboidratos e lipídios, por célula de microalga, são menos abundantes na fase exponencial de crescimento (onde a	Descrita pela equação (5). Estado de crescimento líquido. Apesar de não haver um crescimento líquido em fase estacionária, as células ainda crescem e se dividem. O crescimento é simplesmente equilibrado por um número igual de células morrendo.

		demanda por energia é alta) e aumentam na fase estacionária.	
Fase de Morte celular	de	Mesmo na fase de morte, pode haver células individuais que estão se metabolizando e se dividindo, mas células mais viáveis são perdidas do que as obtidas. Em cultivos comerciais, evita-se a fase de declínio, geralmente a colheita da biomassa é feita quando a densidade celular atinge seu valor máximo, que ocorre ao final da fase exponencial.	Perda líquida de células cultiváveis.

Fonte: Adaptado de (EMDADI; BERLAND, 1989; REIREZ *et al.*; 1989; LOURENÇO, 2006; MAIER, 2009).

Pode-se matematicamente descrever o crescimento celular durante a fase exponencial usando a seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Em que, X é a concentração celular, t é o tempo e μ é a constante de taxa de crescimento específica. A Equação 1 pode ainda ser rearranjada, gerando a Equação 4:

$$\frac{dX}{X} = \mu dt \quad (2)$$

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt \quad (3)$$

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (4)$$

A fase estacionária pode ser expressa pela Equação 5:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (5)$$

3.10. Separação da biomassa e extração de lipídios

O Quadro 3 mostra uma descrição detalhada dos processos de separação da biomassa e extração de lipídios. Estas etapas são de suma importância para viabilizar a produção de biocombustíveis, uma vez que, representam um alto custo para o processo de obtenção de lipídios.

Quadro 3 - Etapas para obtenção de lipídios.

Etapas	Descrição
Floculação	As microalgas levam, em suas células, cargas negativas que impedem a acumulação de células em suspensão e, para neutralizar ou reduzir estas cargas, são adicionados floculantes, para que se juntem às células das microalgas e, assim, aumentarem o tamanho efetivo das partículas, facilitando a sedimentação e filtração. A sedimentação com floculantes (Ecotan e Tanfloc), não acarreta nenhum impacto negativo na produção de biocombustíveis.
Filtração	A filtração é um processo eficaz, que consiste em passar as microalgas, cultivadas em meio líquido, por um meio formado de material poroso, no qual ocorre a retenção das células. Pode ser feita de diferentes formas, dentre elas: microfiltração, filtração de pressão e filtração a vácuo.
Rompimento celular	Antes da extração de lipídio, as células devem ser rompidas por meio de processos mecânicos, tais como moinhos, ultrassom, e processos não mecânicos, como choque osmótico, autoclave, hidrólise enzimática ácida e alcalina.
Extração de lipídios	Existem diversos métodos para extração do lipídio, tais como prensagem e extração por solventes químicos. A composição do lipídio extraído da microalga depende, em parte, do solvente utilizado na sua extração. Diversos tipos de solventes podem ser utilizados na extração, devido à alta polaridade dos lipídios encontrados em microalgas. Os mais utilizados são etanol, hexano e clorofórmio.

Fonte: Adaptado de (GRIMA et al., 1994; GRIMA et al., 2002; LOURENÇO, 2006; D'OCA et al., 2011; RAWAT et al., 2012; FRANCO et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; GUTIÉRREZ et al., 2015).

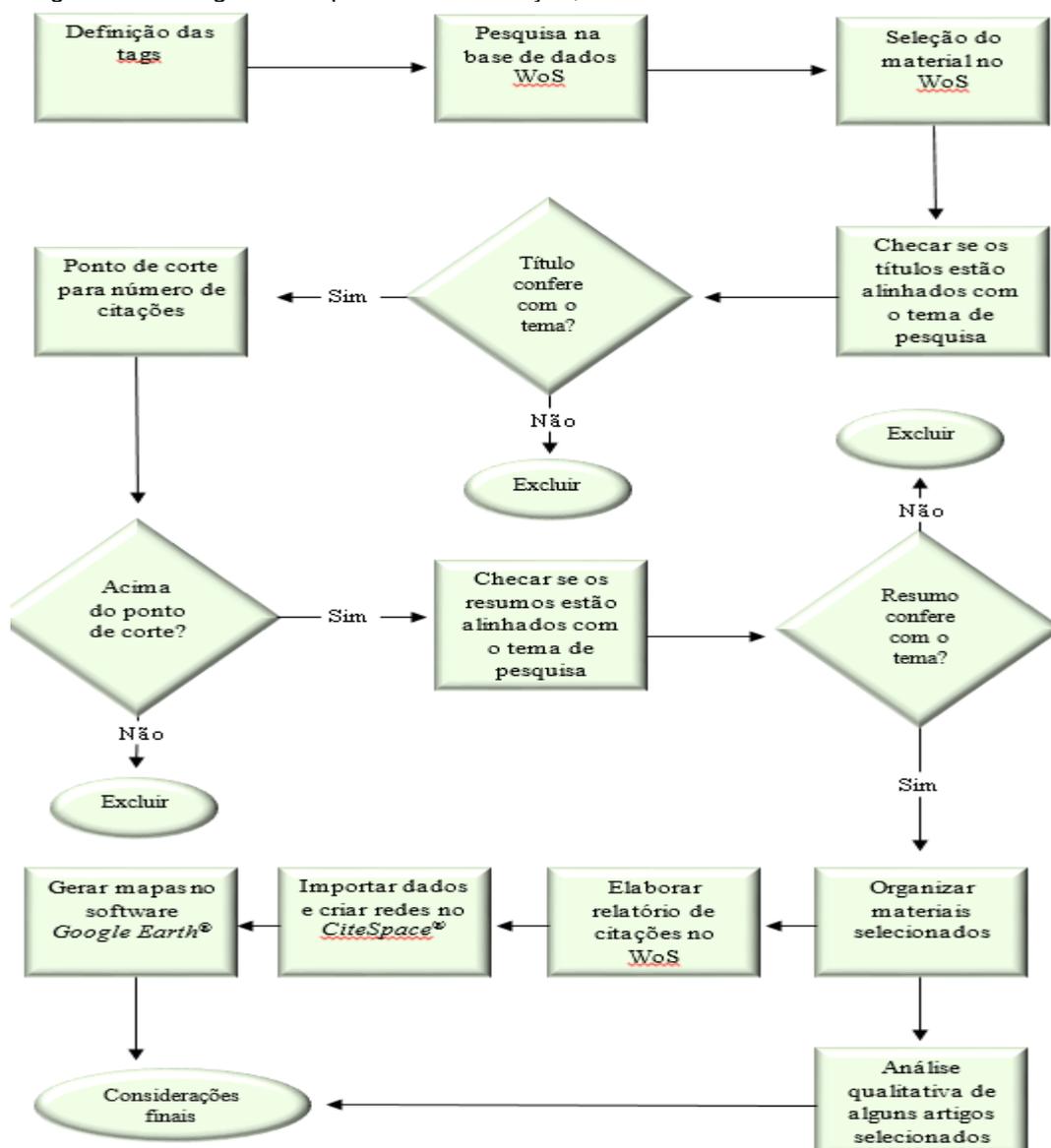
4. METODOLOGIA

4.1. Análise Bibliométrica

A base de dados utilizada foi a plataforma *Web of Science*, que possui periódicos de grande relevância para o meio acadêmico e científico. Primeiramente, foi selecionado todo o período disponível pela base, de 1945 até 2018.

4.1.1. Modelagem de crescimento de microalgas

Figura 7 - Fluxograma do processo de seleção, refino e análise de materiais científicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tendo em vista o potencial das microalgas na geração de biocombustíveis, assim como a aplicação de modelos matemáticos que potencialize a sua produção, observou-se uma oportunidade para a execução de uma análise bibliométrica que gere um portfólio de estudos de excelência acadêmica sobre este assunto.

Como neste trabalho buscou-se predizer por “Modelagem” o crescimento de microalgas durante o cultivo, as palavras-chave (*tags*) foram definidas de modo que representasse o princípio da pesquisa, da seguinte maneira: “*modeling growth microalgae*” or “*modeling growth microalgae Nannochloropsis Oculata*”. Após pesquisa na *Web of Science WoS* (plataforma dos periódicos Capes), foram aplicados diversos refinamentos e informações adicionais foram complementadas pelos softwares *CiteSpace*[®] e *Google Earth*[®], gerando uma quantidade aceitável de referências (Figura 7).

Para a definição do ponto de corte do número de citações, foi aplicado o método descrito por Lacerda (2012), que se baseia em um valor de corte para os artigos mais citados. Os artigos foram dispostos na ordem decrescente em relação ao número de citações, até que representassem um valor próximo de 80% do total de obtido.

4.1.2. Utilização de estruvita como nutriente para cultivo de microalgas

Nesta pesquisa, buscou-se pelo uso de estruvita como provável fonte nutriente substitutiva no cultivo de microalgas. Desta forma, utilizou-se a *tag* (“*estruvite microalgae*”) na pesquisa da base de dados resultando um conjunto de referências. Deste modo, deu-se início ao refino e seleção dos resultados gerados.

O *software* forneceu uma planilha contendo títulos de artigos. Aqueles que não apresentaram relações com o tema da pesquisa foram excluídos. Desta forma um conjunto menor contendo títulos alinhados ao tema compuseram o portfólio de pesquisa sobre o uso de estruvita como nutriente no cultivo de microalgas.

4.2. Meio de cultivo padrão

Para o cultivo de microalgas da espécie *Nannochloropsis oculata*., foi utilizada a cepa e água salgada filtrada fornecidas pela Base Oceanográfica da UFES. Os parâmetros de cultivo bem como as quantidades de nutrientes utilizadas foram

adaptados da metodologia de Guillard (1976) e Lourenço (2006) e estão especificados na Tabela 2. Para cada 1 L de cultivo foi adotada a proporção de 0,001 L de cada solução (fosfato, nitrato e silicato).

Antes do cultivo, realizou-se o pré-tratamento da água salgada adicionando-se cloro (1 gota para 1 L de água) para eliminar possíveis microrganismos contaminantes. Entretanto, antes que esta água fosse adicionada ao meio de cultivo, necessitou-se remover o cloro residual adicionando-se 1 g de tiosulfato de sódio para cada 1 L de água salgada. De modo a garantir que o cloro não causasse danos às microalgas, foi utilizado o reagente DPD (N, N-dietil-p-fenilenediamina) para verificar a remoção total do cloro (reação incolor).

Tabela 2 - Concentração dos componentes da solução de fosfato, nitrato e silicato.

Solução	Componente	Concentração (g L⁻¹)
Fosfato	Fosfato de sódio	16
	Vitamina B12	2
Nitrato	Nitrato de sódio	150
	Cloreto de ferro	9
	EDTA	10
	Metais traços	1
	Silicato de sódio	60
Silicato		

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3. Aparato experimental

Os cultivos foram realizados em um sistema desenvolvido por Nascimento (2018). Este sistema contempla a presença de até 18 fotobiorreatores com capacidade para produzir 3 L de cultivo. O fotobiorreator são potes de plástico (Polietileno tereftalato ou PET), abertos, cuja tampa foi revestida por uma tela para impedir a entrada de poeiras grosseiras e insetos. A escolha por polietileno ocorreu por este ser transparente, o que facilita a entrada de luz; de baixo custo e fácil para limpar. Todos os fotobiorreatores possuem um medidor de nível, junto à superfície lateral.

Os fotobiorreatores foram colocados em uma estante, subdividida em três seções distintas, e igualmente distribuídos, de modo que, a intensidade de luz fosse transmitida igualmente. Para tal, em cada seção, há fontes de luz compostas por lâmpadas de LED de 20 W, que geram uma intensidade luminosa de 4000 ± 200 lux em cada fotobiorreator (medido com luxímetro pelo método ponto a ponto). Durante o

período de cultivo o fornecimento de CO₂ foi realizado utilizando-se um compressor de aeração. Cada compressor exigia um consumo de 3,5 W para fornecer uma vazão constante de 6 L min⁻¹. Para melhorar a distribuição de ar, foram utilizadas pedras porosas de 150 mm e divisores de ar, composto de três saídas. Estes divisores de ar foram conectados aos compressores, através de mangueiras de silicone. Observa-se, na Figura 8, o sistema operacional em pleno funcionamento.

Figura 8 – Imagem do sistema de cultivo múltiplo desenvolvido por nascimento (2018) no 5º dia de cultivo.



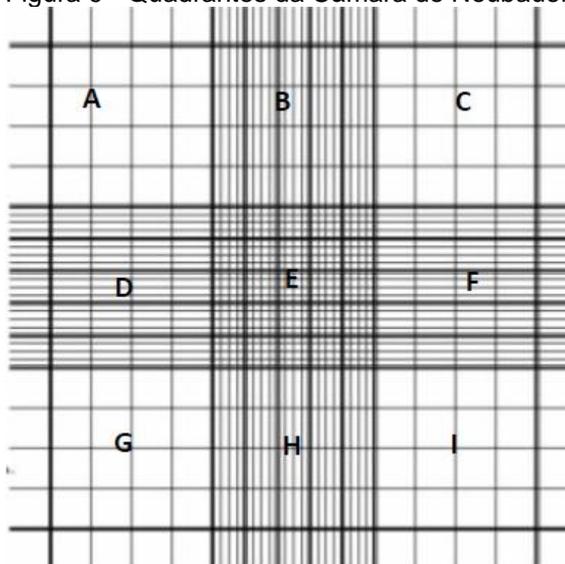
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4. Contagem celular e padronização da concentração inicial

Para fins de padronização da concentração inicial de cultivo, realizou-se a medição da densidade celular presente na cepa que seria utilizada. Na contagem das células utilizou-se uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico. Alíquotas de 0,001 L foram retiradas da cepa e transferidas para câmara de Neubauer. Na Figura 9 pode-se observar como são compostos os 9 quadrantes da câmara de Neubauer, em que cada quadrante representa um quadrado de 1 x 1 mm. Como são três quadrantes A, B e C por A, D e G totalizam uma área de 9 mm². Um quadrante possui 1 mm², que se subdivide em 16 quadrados. Um quadrado do quadrante possui uma área de 1/16 mm². A exceção encontra-se nas laterais (B, D, F e H) e na região central (E). A região central está dividida em vinte e cinco quadros de 1/25 mm², sendo cada um destes subdividindo-se em dezesseis partes resultam em uma área de 1/400 mm².

Portanto, isso totaliza quatrocentos subdivisões de e 0,1 mm² na área central. Como a distância da lamínula até a lâmina (profundidade) mede cerca de 0,1 mm, isso permite obter um volume de 0,1 mm³ em cada quadrante.

Figura 9 - Quadrantes da Câmara de Neubauer.



Fonte: LOURENÇO (2006).

O modo mais adequado, que facilitou a contagem, devido à grande movimentação das células das microalgas, foi por captura de imagens. As fotografias foram analisadas com auxílio do *software ImageJ* cuja imagem estava devidamente ajustada para o quadrante E. Esse quadrante foi escolhido para contagem de células muito pequenas. Todas as células contadas foram as que estiveram dentro dos quadrados e sobre duas linhas do quadrado. A análise foi realizada em triplicata.

Para estimar o número de células utilizou-se a Equação 6, levando-se em consideração a diluição das cepas nos fotobiorreatores para o cultivo.

$$n^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{(n^{\circ} \text{ de quadrantes})} \times \text{Fator de diluição} \times 10.000 \quad (6)$$

4.5. Metodologia experimental e analítica

4.5.1. Cultivo padrão

Após a determinação da concentração inicial de células, as microalgas foram, inicialmente, cultivadas em batelada. Utilizou-se um sistema composto por fotobiorreatores, expostas a luz artificial de LED, com aeração ascendente e constante. Os cultivos foram realizados com temperatura de sala fixa em 22 °C. A duração do cultivo foi determinada até que alcançasse a região da fase morte da curva de crescimento. Parâmetros como temperatura, pH, luminosidade e concentração foram medidos e controlados.

Para a obtenção de uma curva de calibração confiável, os cultivos foram realizados em triplicata, ou seja, três fotobiorreatores com um volume individual e inicial de 3 L de cultura.

A análise do crescimento do cultivo de microalgas foi realizada por contagem celular, coletando-se alíquotas periódicas em dias intercalados.

4.5.2. Determinação do crescimento celular por espectroscopia UV-vis.

As amostras analisadas quanto ao crescimento do cultivo foram transferidas para cubetas de quartzo e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis para a obtenção dos espectros de absorbância. Foi realizada uma varredura entre os comprimentos de onda 500 a 800 nm.

Para a obtenção da curva de calibração, correlacionou-se a concentração celular e absorbância no comprimento de onda que obedecesse a Lei de Beer. De posse de todos os dados, realizou-se uma regressão linear no software *Origin®*.

4.5.3. Determinação do teor de bio-óleo por infravermelho

Realizou-se uma análise qualitativa e quantitativa de percentual de bio-óleo do cultivo, em que, se adotou o método de Pepino (2013). Para a análise qualitativa utilizou-se a relação entre as bandas de estiramento simétrico de CH₂ (2850 cm⁻¹) e CH₃ (2875 cm⁻¹) para verificar ramificações em cadeias alifáticas. Essas relações

permitem averiguar a qualidade do bio-óleo para uso como combustível. Para a análise quantitativa, realizou-se uma comparação da razão entre intensidades das bandas de 2930 cm^{-1} (estiramento assimétrico de CH_2 de lipídios) com um padrão interno da biomassa em 1550 cm^{-1} (relativo ao teor de proteínas na amostra).

Pepino (2013) obteve êxito na correlação linear entre teor de bio-óleo via método gravimétrico, e a razão da intensidade dos sinais em $2930\text{ cm}^{-1}/1550\text{ cm}^{-1}$. Verificou ainda que a extração de lipídios totais pelo método de Bligh e Dyer (1959) não se mostrou eficiente, devido à dificuldade de rompimento da parede celular dos microrganismos e formação de emulsão, inferindo maior erro ao método.

Para a obtenção da correlação linear do teor de bio-óleo e a razão da intensidade dos sinais em $2930/1550$, foi utilizado óleo vegetal da microalga *Schizochytrium sp.* puro, da marca Myralis Pharma, com a elaboração e medição em duplicata de amostras com teores de óleo variando de 0 a 40 % (a cada 5 %), utilizando-se como solvente a composição do meio de cultivo de microalgas. Verificou-se que os nutrientes presentes nos meios de cultivo não interferem nos números de onda referentes aos lipídios.

Preparou-se pastilhas com 50 mg de amostra de biomassa úmida e 600 mg de KBr, seco em estufa a $105\text{ }^\circ\text{C}$. Esta análise foi realizada por meio de um espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier, modelo Cary 630 FTIR, Agilent Technologies. Este equipamento, operando na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com 100 scans e 2 cm^{-1} de precisão. A análise dos picos foi realizada de forma comparativa com os valores de bandas absorção citadas por Barbosa (2008).

4.6. Determinação dos parâmetros de crescimento celular

4.6.1. *Taxa de Crescimento Específico (μ)*: Esta taxa foi estimada, para cada experimento, conforme Equação 7 (LOURENÇO, 2006). O conhecimento desta variável possibilitou prever a evolução da concentração das microalgas ao longo do crescimento exponencial e como foi o comportamento celular frente às diversas condições ambientais e meios de cultura.

$$\mu = \frac{\ln(X - X_0)}{\Delta t} \quad (7)$$

4.6.2. *Velocidade de crescimento (k)*: Este parâmetro foi determinado e comparado entre os diferentes cultivos. A Equação 8 foi empregada para estimar número de divisões no tempo (DERNER, 2006).

$$k = \left(\frac{3,322}{\Delta t} \right) \cdot \log \left(\frac{X}{X_0} \right) \quad (8)$$

Cabe ressaltar que a densidade celular máxima (DCM) é o ponto da máxima concentração de células obtida em todo o tempo de cultivo. Para determinação dos cálculos de μ e k , foram considerados a região que envolve apenas a fase exponencial, na curva de crescimento.

4.7. Análise das condições de luminosidade no crescimento microalgal

4.7.1. Abordagem experimental

Conforme descritos, a seguir três diferentes condições de luminosidade foram investigadas mantendo-se fixos o meio de cultivo, temperatura (22°C) e a aeração do sistema. Os cultivos foram conduzidos até que se chegasse ao início da fase estacionária, estabelecida experimentalmente no tempo de 21 dias de cultivo, e realizados em triplicata.

- Condição 1: intensidade de luz programada para atuar de forma constante representada por 24_h luz: 00_h escuro;
- Condição 2: intensidade de luz programada para atuar em dias intercalados, representada na forma de 24_h luz: 24_h escuro;
- Condição 3: intensidade de luz programada para atuar na metade do dia, representada na forma de 12_h luz:12_h escuro.

Em cada condição de luminosidade, os parâmetros de crescimento celular foram calculados e teor de bio-óleo foi determinado. Os dados experimentais serviram de base para o ajuste dos modelos de luminosidade.

4.7.2. Modelagem matemática

O modelo não linear de Gompertz (Equação 9) é um modelo matemático relativo a séries temporais. Este modelo descreve o comportamento sigmoidal do crescimento de microalgas e revela a predição e otimização da produção de biomassa sob diferentes condições ambientais.

$$y(t) = W(C). \exp \left\{ - \exp \left[\left(\frac{U(C). \exp(1)}{W(C)} \right) \cdot (t_m(C) - t) + 1 \right] \right\} \quad (9)$$

Em que, y corresponde a concentração de biomassa microalgal (células.mL⁻¹), W e U são parâmetros da equação em função da condição de luminosidade, t_m é o tempo morto (dias), t é tempo (dias) e C é a condição de luminosidade.

Çelekli e coladores (2008) propõem uma modificação da Equação 9. Esta modificação representa uma análise de regressão não linear onde considera-se tanto o tempo de cultivo como a concentração de fósforo no meio de cultivo, sendo representada pela Equação 10.

$$y(t) = (a(C) + b(C).F). \exp \left\{ - \exp \left[\left(\frac{(c(C) + d(C).F). \exp(1)}{(a(C) + b(C).F)} \right) \cdot ((e(C) + f(C).F) - t) + 1 \right] \right\} \quad (10)$$

Em que: y corresponde a concentração de biomassa microalgal (células.mL⁻¹), a, b, c, d, e e f são parâmetros da equação em função da condição de luminosidade, F é a concentração de fósforo (mg.L⁻¹), t é tempo (dias) e C é a condição de luminosidade.

Baseado em Stephanopoulos (1984), o ajuste da curva de crescimento da biomassa pode apresentar um comportamento de uma curva sigmoidal, similar a um modelo dinâmico de um sistema de 2ª ordem com característica criticamente amortecido. Neste contexto, o autor propõe uma curva de ajuste para o crescimento da biomassa conforme descrita pela Equação 11. Os limites deste modelo são:

$$\begin{aligned}
 &\text{Para } t \leq t_m(C) && y(t) = y_0 \\
 &\text{Para } t > t_m(C) && y(t) = y_0 + A(C) \cdot \left[1 - \left(1 + \frac{t-t_m(C)}{B(C)} \right) \cdot e^{-\frac{t-t_m(C)}{B(C)}} \right]
 \end{aligned} \tag{11}$$

Em que, y corresponde a concentração de biomassa microalgal (células.mL⁻¹), A e B são parâmetros da equação em função da condição de luminosidade, t_m é o tempo morto (dias) que representa o tempo referente fase lag ou fase de adaptação, t é tempo (dias), y_0 corresponde a concentração de biomassa inicial (células.mL⁻¹) e C é a condição de luminosidade.

Os parâmetros de cada modelo foram estimados para as condições de luminosidade propostas, utilizando-se o software *Origin*®. O tempo morto foi pré-fixado diretamente dos dados experimentais e a concentração de fosfato foi de 16 mg.L⁻¹. A partir da obtenção dos parâmetros, seguiu-se para a modelagem em *Matlab*®, onde variou-se o tempo de 0 a 21 dias, com intervalos de 0,1 dia.

Neste trabalho, para avaliar se os dados preditos pelos modelos preveem de forma satisfatória os dados reais, estes foram comparados com os experimentais. Os modelos utilizados têm por objetivo prever a condição de luminosidade adequada para otimizar os parâmetros de crescimento celular, sobretudo a densidade celular máxima.

4.8. Metodologia estatística para análise do uso de estruvita como nutriente

Neste trabalho, utilizou-se uma matriz de planejamento experimentos de dois níveis a três fatores (2³) com um ponto central. O planejamento foi realizado em duplicata. Foram escolhidas como fatores de estudo as variáveis estruvita (rica em fósforo), fosfato e nitrato. A estruvita utilizada no cultivo de microalgas, é um composto obtido pela precipitação de solução sintética, rica em íon amônio, juntamente com as soluções de fosfato de potássio e cloreto de magnésio, em meio básico (pH=8). A concentração da solução de estruvita utilizada no cultivo de microalgas, foi determinada por análise estequiométrica baseando-se nas concentrações ótimas das soluções de fosfato do meio de cultivo padrão, conforme mencionadas por Lourenço e Guillard (apresentadas na Tabela 2).

Os cultivos foram conduzidos com temperatura de sala (22 °C), aeração fixada e luminosidade constante na condição de 12_h luz: 12_h escuro. As variáveis

respostas foram densidade celular máxima e teor de bio-óleo. O controle do crescimento celular foi realizado até alcançar a fase estacionária, em dias intercalados, juntamente com a medição do pH.

Cabe destacar que os demais componentes do meio de cultivo foram mantidos constantes. Os limites dos fatores e a distribuição dos ensaios podem ser visualizadas pelas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Fatores do planejamento fatorial 2³.

Fatores	Limite inferior (-1)	Ponto central (0)	Limite superior (+1)
E: Estruvita	0	0,5 mL.L ⁻¹ cultivo	1 mL.L ⁻¹ cultivo
F: Fosfato	0	0,5 mL.L ⁻¹ cultivo	1 mL.L ⁻¹ cultivo
N: Nitrato	0	0,5 mL.L ⁻¹ cultivo	1 mL.L ⁻¹ cultivo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Planejamento fatorial 2³.

Ensaio	E	F	N
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9. Separação da biomassa e extração do bio-óleo via Soxhlet

A separação de biomassa foi realizada no início da fase estacionária, determinada experimentalmente no 21^o dia de cultivo. Neste trabalho, a extração do bio-óleo foi realizada para as melhores condições experimentais envolvendo luminosidade e concentração de estruvita. Adotou-se a metodologia de Lima (2018) para a extração do bio-óleo, levando-se em conta a rota de menor gasto energético avaliada, via base úmida e utilizando-se hexano como solvente. As etapas experimentais adotadas estão detalhadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Etapas experimentais para obtenção do bio-óleo.

Etapas	Descrição
Floculação	Ao final da etapa de cultivo, foi realizada a floculação das microalgas utilizando o Tanfloc SG, seguindo a proporção de 7,5 mL de solução (50 g.L ⁻¹) para cada 1,5 L de cultivo. O período de decantação foi de 24 h.
Filtração	Foi realizada filtração a vácuo obtendo-se a biomassa úmida.
Rompimento celular	Para cada 5 g de biomassa algal adicionou-se 25 mL de solvente, que posteriormente foi levado para um banho ultrassônico com frequência de 25 kHz. O tempo de exposição ao ultrassom foi de 60 min.
Extração de lipídios	Após a ultrassonificação, a biomassa foi colocada em um filtro faixa branca e inserida no extrator Soxhlet. Quanto ao balão, ele foi previamente pesado e sua massa anotada, após pesado adicionou-se 200 mL de solvente. Posteriormente o conjunto extrator e balão foram acoplados a um condensador e aquecidos para a ebulição do solvente. O tempo de extração foi de 4 h (≈ 15 ciclos). O balão foi retirado do extrator e o solvente foi evaporado em um rotaevaporador, por 4 h. Após a utilização do rotaevaporador o balão foi levado a secagem em estufa a 373 K (100 °C) até o peso constante e resfriado em dessecador a vácuo (ASTM 1984).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O rendimento foi estimado pelo percentual da massa de bio-óleo em relação a massa de biomassa utilizada, conforme Equação 12.

$$\text{Rendimento: } \frac{\text{massa do óleo}}{\text{massa da biomassa utilizada}} * 100 \quad (12)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise Bibliométrica (Modelagem e Crescimento microalgal)

5.1.1. Relatório de citações

As palavras-chave “*modeling growth microalgae*” ou “*modeling growth microalgae Nannochloropsis Oculata*” pesquisadas na base de dados *Web of Science* retornou um total de 1360 publicações. Devido à grande quantidade de material encontrado, foi feita uma seleção escolhendo-se apenas artigos científicos de língua inglesa publicados nos últimos 15 anos (2003 a 2018). Após este primeiro refino, o número obtido reduziu para 909 artigos. Esses dados foram exportados para uma planilha *Microsoft Excel*[®] para a realização das demais etapas presentes no fluxograma (Figura 7).

Passada esta etapa, foi checado visualmente na planilha, cada um dos 909 títulos dos artigos, excluindo-se aqueles não estavam relacionados ao tema de pesquisa. Esta seleção reduziu 82,07% do total de artigos obtidos, ou seja dos 909, 163 artigos possuíam títulos alinhados com a proposta da pesquisa.

Aplicando-se o método de Lacerda (2012) nos 163 artigos verificou-se que apenas 27% do total de artigos detinham 80% das citações, restando, portanto, 44 artigos. Por fim, após leitura de cada um dos resumos, de forma criteriosa, restaram 13 manuscritos, que atendiam aos critérios mencionados no fluxograma apresentado na Figura 7. Esses 13 artigos compuseram o portfólio de pesquisa sobre modelagem de crescimento de microalgas.

A Tabela 5 especifica o título dos artigos, o periódico no qual foi publicado, o ano de publicação, e o total de citações.

Tabela 5 - Relação dos artigos com número de citações por ano.

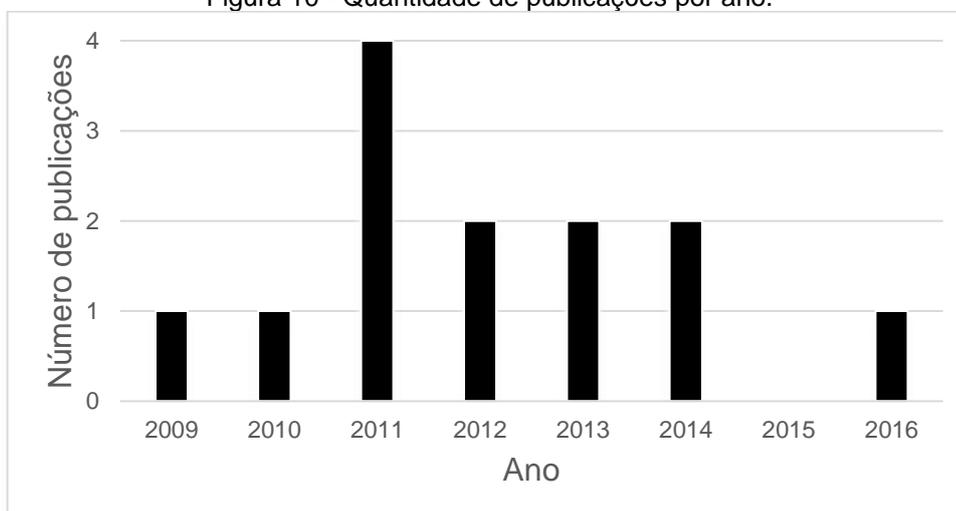
Título	Fonte	Ano Publicação	Total Citações	Citação Ano
Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga <i>scenedesmus</i> sp.	<i>Bioresource Technology</i>	2010	350	38,89
Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO ₂ mitigation and biofuel production	<i>Journal of Process Control</i>	2011	125	15,63
Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems	<i>Bioresource Technology</i>	2011	90	11,25
Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: a mathematical model	<i>Bioresource Technology</i>	2011	80	10
Kinetic characteristics and modeling of microalgae <i>chlorella vulgaris</i> growth and co ₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon	<i>Bioresource Technology</i>	2016	26	8,67
A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds	<i>Biotechnology and Bioengineering</i>	2013	43	7,17
Comprehensive modeling and investigation of the effect of iron on the growth rate and lipid accumulation of <i>chlorella vulgaris</i> cultured in batch photobioreactors	<i>Bioresource Technology</i>	2014	33	6,60
Mathematical model of <i>chlorella minutissima</i> utex2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions	<i>Bioresource Technology</i>	2011	51	6,38
Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions	<i>Bioresource Technology</i>	2014	30	6
Enhancement of microalgal biomass and lipid productivities by a model of photoautotrophic culture with heterotrophic cells as seed	<i>Bioresource Technology</i>	2012	29	4,14

Experimental analysis and model-based optimization of microalgae growth in photo-bioreactors using flue gas	<i>Biomass & Bioenergy</i>	2012	28	4
Photobiotreatment model (phbt): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater	<i>Environmental Technology</i>	2013	23	3,83
Modeling of biomass production by spirulina platensis as function of phosphate concentrations and ph regimes	<i>Bioresource Technology</i>	2009	23	2,30

Fonte: Adaptado de *Web of Science*.

A análise dos dados da Tabela 5 demonstra que os 13 artigos selecionados possuem 931 citações, com uma média de 71,62 citações por item. Além disso, os artigos são datados de 2009 até 2016, no qual resultam 93,10 citações por ano. É possível avaliar na Figura 10 o comportamento de publicação dos autores no tema de pesquisa, em relação a quantidade de publicações por ano.

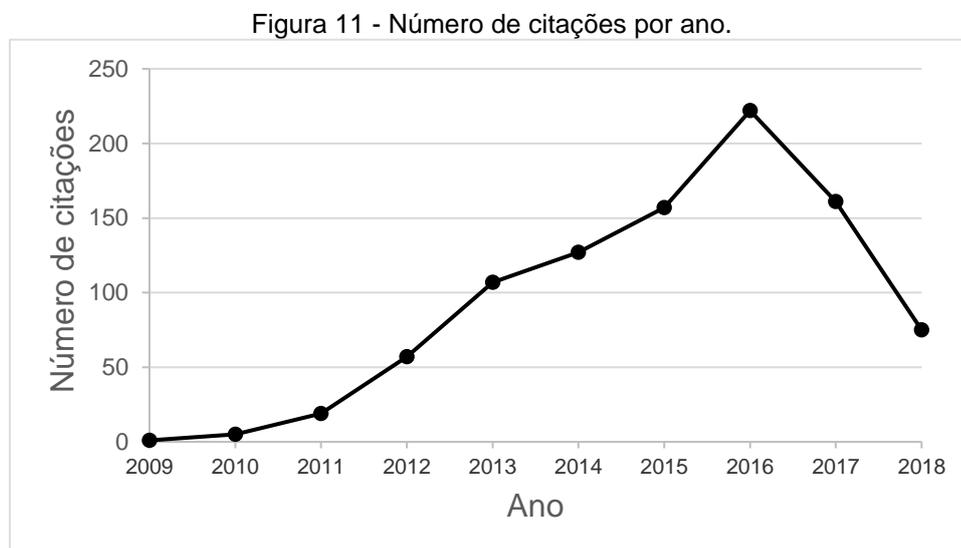
Figura 10 - Quantidade de publicações por ano.



Fonte: Adaptado de *Web of Science*.

A pequena amostra de artigos selecionados causou uma falta de uniformidade no crescimento do número de publicações, visto na Figura 10. Desta maneira, fez-se necessário também elaborar uma análise quanto ao número de citações gerados por estas publicações no decorrer dos anos, como demonstrado pela Figura 11. Observa-

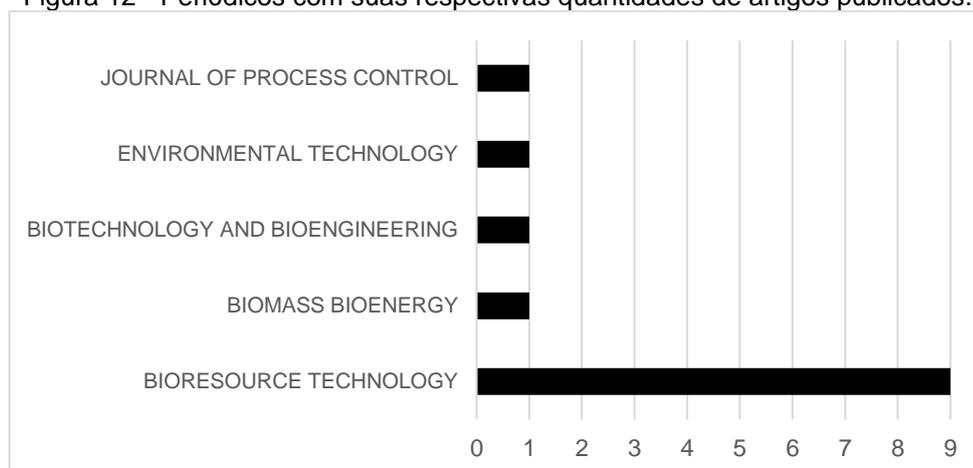
se o aumento do número de citações por parte dos artigos selecionados para o portfólio no decorrer dos anos, tendo seu máximo no ano de 2016



Fonte: Adaptado de Web of Science.

O periódico no qual um artigo é publicado mostra sua relevância para a sociedade acadêmica. O tema proposto neste estudo possui artigos publicados nas mais diversas revistas científicas, com distintas avaliações, e diferentes temas de pesquisa. As revistas relacionadas aos 13 artigos selecionados para o portfólio são mostradas na Figura 12.

Figura 12 - Periódicos com suas respectivas quantidades de artigos publicados.



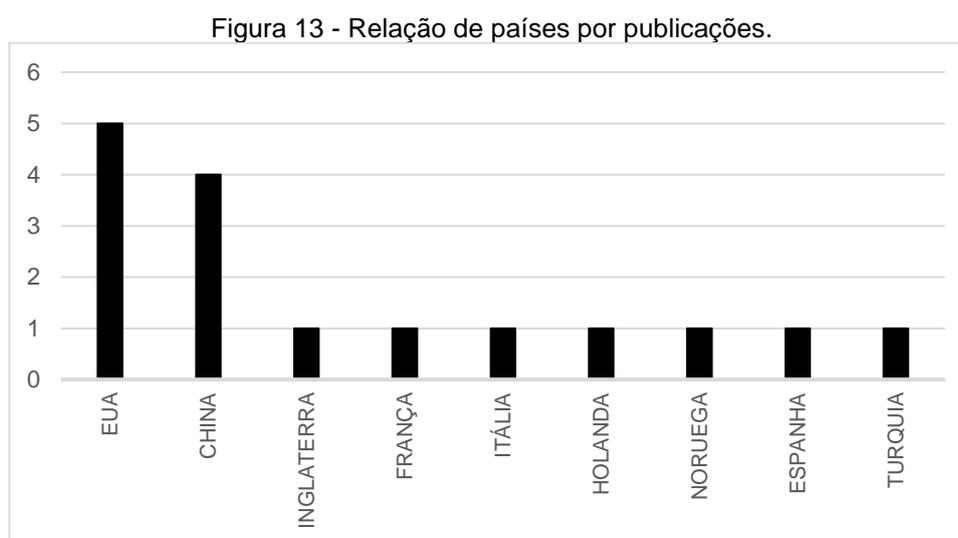
Fonte: Adaptado de Web of Science.

De acordo com Barata (2016) o Qualis Periódicos é um dos instrumentos fundamentais para a avaliação do quesito produção intelectual, agregando o aspecto quantitativo ao qualitativo. A revista com a maior quantidade de publicação entre os

artigos selecionados para o portfólio possui o maior conceito Qualis Capes, A1, de acordo com pesquisa feita na plataforma *Sucupira*. Este fato mostra a grande relevância que os artigos selecionados possuem para a sociedade acadêmica.

De modo a ver a relação de países que estão realizando pesquisas sobre a modelagem do crescimento de microalgas, elaborou-se o gráfico da Figura 13.

Nesse sentido, os Estados Unidos aparecem como líder em termos de publicações neste tema, fato justificado por ser um país pioneiro em pesquisas científicas, mantendo-se como uma potência. Também é importante destacar a participação da China em pesquisas científicas, fato corroborado por Jabbour (2008) ao mostrar que a China se mostra voltada a grandes investimentos em Ciência e Tecnologia, em resposta à iminência de problemas gerados pela escassez de recursos energéticos, degradação do meio ambiente e principalmente emissão de CO₂.



Fonte: Adaptado de Web of Science.

Para se avaliar o relacionamento entre os autores e coautores no mundo, fez-se o uso do software *CiteSpace* para projeção das redes de parcerias de grupo de pesquisa, e através de sua função *geographical* gerou-se os gráficos por intermédio do software *Google Earth* (Figuras 14 e 15).

Na Figura 14 nota-se os relacionamentos intercontinentais entre grupos de pesquisa dando destaque para a conexão dos Estados Unidos com a Noruega e China. A direta vê-se a parceria entre a Universidade do Arizona (EUA) com a

Universidade de Oslo (Noruega), já a esquerda a parceria entre a Universidade da Califórnia (EUA) e a Universidade de Pequim (China).

Analisando a Figura 15 dá-se destaque para a conexão entre grupos de pesquisa da Itália, mais precisamente localizados em Génova e Cagliari. Nota-se também a existência de grupos de pesquisa isolados, localizados na Espanha, França, Reino Unido e Países Baixos.

Figura 14 - Mapa do Google Earth gerado pelo CiteSpace.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Mapa do Google Earth gerado pelo CiteSpace.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Trabalhos em coautoria nos anos mais recentes estão ligados por linhas em vermelho, enquanto que as colaborações mais antigas são mostradas em linhas verde. Deste modo, as relações dos grupos de pesquisa de Estados Unidos, Noruega e China são mais antigas do que aquelas entre os grupos de pesquisa na Itália.

5.1.2. Análise Qualitativa do portfólio (Estado da arte)

Esta seção apresenta uma síntese dos artigos selecionados, escolhendo-se os 8 artigos mais citados por ano, por terem uma maior importância para a comunidade acadêmica.

Xin et al. (2010) afirmam que as microalgas têm alto potencial para remover nutrientes inorgânicos das águas residuais e produzir biodiesel. Eles estudaram os efeitos das concentrações de nitrogênio e fósforo no crescimento, na absorção de nutrientes e no acúmulo de lipídios de uma microalga de água doce *Scenedesmus sp.* LX1. O crescimento da LX1 estava de acordo com o modelo Monod, porém a produtividade lipídica / volume unitário de cultura, não foi melhorada.

Bernard (2011) apontou que as microalgas oleaginosas são consideradas potenciais produtoras de biocombustível no futuro, uma vez que, sob condições de privação de nitrogênio, elas são capazes de conter grandes quantidades de lipídios, enquanto consomem CO₂ industrial. Segundo ele a previsão do comportamento dos processos baseados em microalgas é delicada devido à forte interação entre biologia (desenvolvimento de microalgas e respiração) e física (atenuação de luz e hidrodinâmica), deste modo, ele revisou os modelos existentes e, em particular, o modelo Droop, que tem sido amplamente utilizado para prever o comportamento de microalgas sob limitação de nutrientes.

Quinn, Winter e Bradley (2011) explicam que a escalabilidade dos sistemas de crescimento de microalgas é um tópico de pesquisa primário em antecipação à comercialização de biocombustíveis baseados em microalgas. Eles apresentaram a construção e validação de um modelo de biomassa de microalgas e acúmulo de lipídios em um fotobiorreator de escala industrial em ambiente externo.

Packer et al. (2011) reforçaram que devido ao grande potencial de produção lipídica, as microalgas têm sido sugeridas como fontes promissoras para a produção de biocombustíveis. No entanto, não foram desenvolvidos modelos para a síntese de lipídios de algas com relação a nutrientes e luz para prever a produção de lipídios e

ajudar a melhorar o processo de produção, assim, eles propuseram um modelo matemático descrevendo a dinâmica de crescimento e a produção de lipídios neutros de microalgas verdes cultivadas em culturas de lotes. Para meios de crescimento com baixa concentração de nitrogênio, o modelo concordou com os dados experimentais; no entanto, com alta concentração de nitrogênio, o modelo superestimou a biomassa.

Yang et al. (2011) desenvolveram um modelo matemático para descrever o crescimento de microalgas, produção de lipídios e consumo de glicerina sob condições fotoheterotróficas baseadas em equações logísticas. Os resultados mostraram que a concentração inicial de glicerina, foi o fator mais significativo para o crescimento de microalgas e produção de lipídios.

Huesemann et al. (2013) desenvolveram um modelo de crescimento de biomassa de microalgas para o rastreamento de novas estirpes quanto ao seu potencial para exibir elevadas produtividades de biomassa sob condições repletas de nutrientes em fotobiorreatores ou lagos ao ar livre. O modelo foi bem-sucedido em prever a taxa de crescimento de biomassa nestas culturas em lotes de garrafas Roux durante a fase linear limitada à luz a diferentes intensidades de luz incidente.

Concas et al. (2014) afirmaram que trabalhos recentes indicam que cepas específicas de microalgas são capazes de aumentar, simultaneamente, sua taxa de crescimento e conteúdo lipídico quando cultivadas sob concentrações adequadas de ferro. Desta forma, eles propuseram um modelo matemático abrangente descrevendo o efeito do ferro na síntese de clorofila, assimilação de nitrogênio, taxa de crescimento e acúmulo de lipídios em uma cepa de água doce de *C. vulgaris*. Os resultados do modelo foram comparados com sucesso com dados experimentais que confirmam o efeito positivo das concentrações crescentes de ferro na produtividade lipídica de *C. vulgaris*.

Chang et al. (2016) afirmaram que otimizar o processo de crescimento de microalgas é um pré-requisito essencial para a captura efetiva de CO₂ usando microalgas em fotobiorreatores. Eles investigaram as características cinéticas do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em resposta à intensidade de luz e concentração de carbono inorgânico dissolvido. Os modelos foram capazes de prever a evolução temporal do crescimento de *C. vulgaris* e as taxas de biofixação de CO₂ das fases lag até estacionária, comprovadas por experimentos de verificação.

De acordo com as informações coletadas nos artigos selecionados, foi elaborada uma Matriz SWOT, de modo a avaliar os pontos negativos e positivos em relação ao uso de microalgas no âmbito mundial (Tabela 6).

Segundo Lima et al. (2018), na matriz SWOT, as forças são fatores internos positivos, como vantagens; por outro lado, as fraquezas são condições internas desfavoráveis, trazendo limitações e desvantagens. Lima (2018) ainda destaca que os fatores externos são divididos entre oportunidades e ameaças, sendo que as oportunidades são tendências externas que podem contribuir para a concretização dos objetivos, enquanto as ameaças são as condições externas que não podem ser controladas, e se caracterizam como prejudiciais à execução dos objetivos.

Tabela 6 - Matriz SWOT.

Positivo	Negativo
Forças	Fraquezas
<ul style="list-style-type: none"> - Grande geração de lipídios; - Diminuição dos gases de efeito estufa CO₂; - Modelagem pode prever o crescimento e geração de lipídios; 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo elevado quando utilizado em pequena escala; - Forte dependência da luminosidade;
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> - Potencial produtora de biocombustíveis do futuro; - Potencial para remover nutrientes inorgânicos de águas residuais; 	<ul style="list-style-type: none"> - Carência de estudos de modelagem para várias espécies de microalgas; - Pode afetar zonas litorâneas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa maneira é possível afirmar que o estudo do tema “Modelagem do crescimento de microalgas” é extremamente importante, tendo em vista a previsão do crescimento e geração de lipídios proveniente de microalgas, mas também para a geração de novos modelos de predição para espécies de microalgas até o momento não avaliadas, como é o caso da *Nannochloropsis Oculata*.

Com o exposto pode-se aferir então que as microalgas são sugeridas como fontes promissoras para a produção de biocombustíveis, por serem capazes de conter grandes quantidades de lipídios. O desenvolvimento de modelos de crescimento de microalgas para a síntese de lipídios com relação a nutrientes e luz são extremamente

importantes para prever a produção de lipídios e ajudar a melhorar o processo de produção.

Por meio da pesquisa bibliométrica, foi constatado que dentro da plataforma *Web of Science*, o tema “Modelagem de crescimento de microalgas” se mostra relevante, devido ao notável aumento das quantidades de publicações e citações ao longo dos últimos anos por vários países, dando destaque aos Estados Unidos que lideram as publicações no tema analisado.

Foram selecionados 13 artigos para compor o portfólio, seus resultados servem de base para compor o referencial bibliográfico de pesquisas futuras. Uma análise de todos os artigos que compõem o portfólio mostrou que não foram analisados ainda modelos para crescimento de microalgas da espécie *Nannochloropsis Oculata*, gerando uma grande oportunidade de pesquisa sobre este tema inovador.

5.2. Análise Bibliométrica (Estruvita como nutriente)

5.2.1. Relatório de citação

Este tópico visa mapear o desenvolvimento da atividade científica do tema “Utilização de estruvita como nutriente para cultivo de microalgas”, através da ferramenta de pesquisa acadêmica *Web of Science – WoS* (plataforma dos periódicos Capes). A base de dados retornou 16 referências, dentre essas, apenas 9 artigos estavam alinhados ao tema de pesquisa. Com base nessa pequena quantidade de material gerado, é possível observar como este estudo é recente e pertinente.

Os artigos selecionados estão dispostos na Tabela 7, em ordem decrescente de citações por ano, assim como a listagem do ano de publicação, título do artigo, periódicos e total de citações.

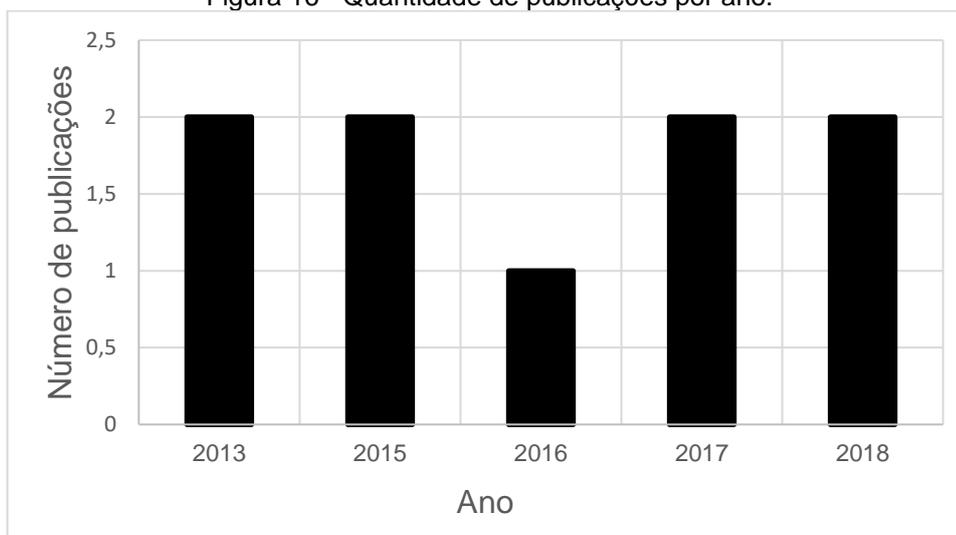
Tabela 7 - Relação dos artigos com número de citações por ano.

Título	Fonte	Ano Publicação	Total Citações	Citação Ano
<i>Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by chlorella vulgaris ysw-04</i>	<i>Applied microbiology and biotechnology</i>	2013	52	8,67
<i>Cultivation of the marine macroalgae chaetomorpha linum in municipal wastewater for nutrient recovery and biomass production</i>	<i>Environmental science & technology</i>	2017	10	5
<i>Removal of nitrogen and phosphorus from piggery wastewater effluent using the green microalga scenedesmus obliquus</i>	<i>Journal of environmental engineering</i>	2013	28	4,67
<i>Biodiesel production from oleaginous yeasts using livestock wastewater as nutrient source after phosphate struvite recovery</i>	<i>Fuel</i>	2016	7	2,33
<i>Growth of mono- and mixed cultures of nannochloropsis salina and phaeodactylum tricornutum on struvite as a nutrient source</i>	<i>Bioresource Technology</i>	2015	9	2,25
<i>Struvite as alternative nutrient source for cultivation of microalgae chlorella vulgaris</i>	<i>Journal of the taiwan institute of chemical engineers</i>	2015	8	2
<i>Cultivation of lipid-producing microalgae in struvite-precipitated liquid digestate for biodiesel production</i>	<i>Biotechnology for biofuels</i>	2018	1	1
<i>Enhanced microalgae cultivation using digested kitchen waste sewage treated with struvite precipitation</i>	<i>International journal of agricultural and biological engineering</i>	2017	1	0,5
<i>The optimization of microalgal culturing in liquid digestate after struvite precipitation using gray relational analysis</i>	<i>Environmental science and pollution research</i>	2018	0	0

Fonte: Adaptado de Web of Science.

Os 9 artigos selecionados possuem 116 citações no total, com uma média de 12,89 citações por item. Além disso, os artigos são datados de 2013 até 2018. A Figura 16 relaciona a quantidade de publicações por ano.

Figura 16 - Quantidade de publicações por ano.



Fonte: Adaptado de Web of Science.

Devido à falta de uniformidade no crescimento do número de publicações ocasionada pela pequena amostra de artigos selecionados, foi necessário realizar uma análise quanto ao número de citações gerados pelas publicações ao longo dos anos, conforme a Figura 17.

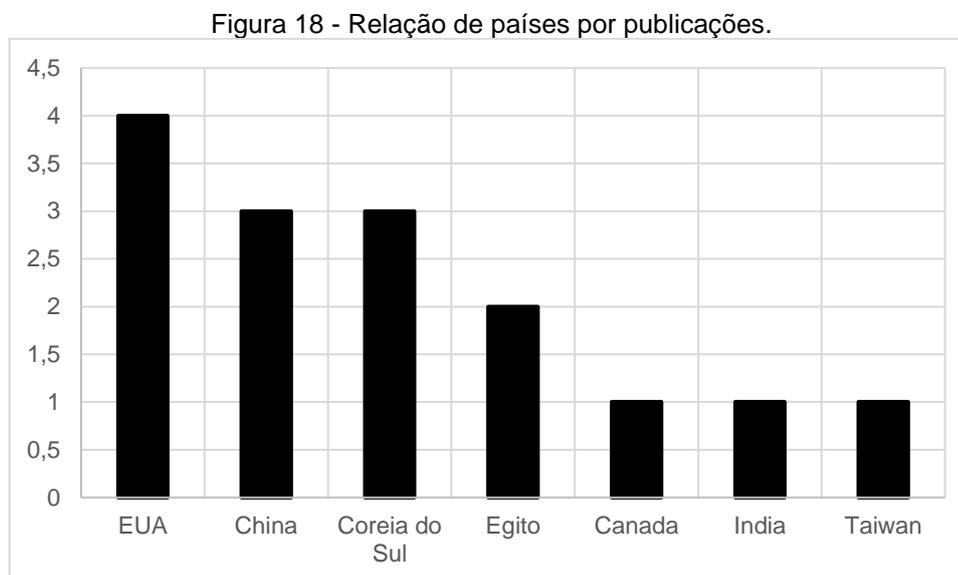
Figura 17 - Número de citações por ano.



Fonte: Adaptado de Web of Science.

Observa-se o aumento do número de citações por parte dos artigos selecionados para o portfólio no decorrer dos anos, tendo seu máximo no ano de 2018. Isso mostra como o tema de pesquisa é recente e válido, tendo aumentado o número de citações nos últimos anos.

A Figura 18 mostra a relação de países que estão realizando pesquisas sobre a utilização de estruvita como nutriente de cultivo de microalgas.



Fonte: Adaptado de Web of Science.

Tem-se os Estados Unidos como líder em termos de publicações neste tema. Também é importante destacar a participação da China em pesquisas científicas, como visto em seções anteriores.

5.2.2. Análise Qualitativa do portfólio (Estado da arte)

Davis et al. (2015) estudaram a adequabilidade da estruvita bruta e purificada ($MgNH_4PO_4$), um importante precipitado em correntes de águas residuárias. Ela foi investigada para a substituição renovável de recursos convencionais de nitrogênio e fosfato para o cultivo de microalgas. A água residual de efluente bovino, fonte da estruvita bruta, foi caracterizada por N / P solúvel, metais traço e componentes bioquímicos e comparada com o mineral purificado. Ensaio de cultivo usando estruvita como uma fonte principal de nutrientes foram conduzidos usando duas linhagens de produção de microalgas, *Nannochloropsis salina* e *Phaeodactylum tricorutum*, em pistas de laboratório e ao ar livre em escala piloto em uma variedade de condições sazonais. Verificou-se que tanto os meios à base de estruvita em bruto como os purificados resultaram em produtividades de biomassa comparáveis com as formulações de meios estabelecidas (rendimento de co-cultura exterior máximo de 20 ± 4 g de AFDW / m^2 / dia). A análise da absorção de nutrientes pela alga sugere que

a estruvita fornece maior eficiência de utilização de nutrientes, e que a estruvita bruta satisfaz as exigências de metais traço e resulta em aumento da produtividade do pigmento para ambas as cepas de microalgas.

Moed, Lee e Chang (2015) afirmaram que cultivar microalgas para biocombustíveis e derivados pode gerar altos custos com nutrientes. Dessa forma, o uso de estruvita como um nutriente alternativo para o cultivo de microalgas (*Chlorella vulgaris*) foi testado. As receitas foram projetadas e adotadas para suplementar a estruvita, usando a Bold's Basal Media (BBM) como fonte de nutrientes de referência e gás CO₂ enriquecido (10% v / v) ou ar como fonte de gás. As células de *C. vulgaris* apresentaram um crescimento celular satisfatório com a maioria das receitas testadas. Os conteúdos de lipídios (C15-C18) para microalgas cultivadas variaram de 1,01 a 3,98 g / L. Os autores concluíram que a estruvita é uma fonte nutritiva viável para o crescimento *C. vulgaris*, além de possuir menor custo se comparada a BBM.

Jiang et al. (2018) pontuaram que a utilização de digerido líquido da indústria do biogás como meio para cultura de microalgas produtoras de lipídios é considerada mutuamente benéfica para a valorização do digerido e para a redução do custo do cultivo de microalgas. No entanto, os baixos níveis de transmitância e altos níveis de amônio no líquido digerido influenciam negativamente o crescimento das microalgas. A precipitação de estruvita foi usada para pré-digerir o líquido digerido. Para obter sobrenadante precipitado de estruvita com uma transmitância ideal. Este estudo descreveu uma nova maneira de combinar o tratamento com digestores líquidos e a produção de biodiesel de microalgas. O digerido líquido pré-tratado com estruvita pode ser usado para a cultura de *D. ehrenbergianum* para produção de biodiesel.

Por meio da pesquisa bibliométrica, foi constatado que dentro da plataforma *Web of Science*, o tema "Utilização de estruvita como nutriente de cultivo de microalgas" se mostra relevante e recente.

5.3. Concentração celular inicial

Primeiramente foi obtida a densidade celular inicial padrão (X_0) utilizada em todos os cultivos. O valor desta densidade é mostrado na Equação 13:

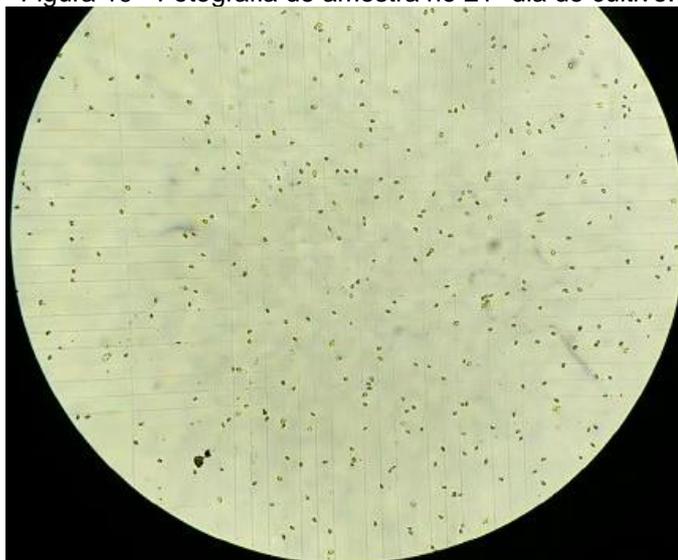
$$X_0 = 23,33 \times 10^4 \text{ células/mL} \quad (13)$$

5.4. Cultivo padrão

Com a concentração celular inicial determinada, seguiu-se para a execução do cultivo em triplicata, com medições em dias intercalados da densidade celular utilizando-se a câmara de Neubauer (Figura 19) e retirada de pequenas amostras para medição da absorbância em espectrofotômetro UV-vis.

Para a confecção da curva padrão de crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata*, foi realizada uma varredura entre os comprimentos de onda de 500 – 800 nm do espectro da região do UV-vis (Figura 20). Desta forma, o comprimento de onda de maior intensidade foi registrado em 681 nm, então, este comprimento de onda foi utilizado para as análises do crescimento da microalga estudada.

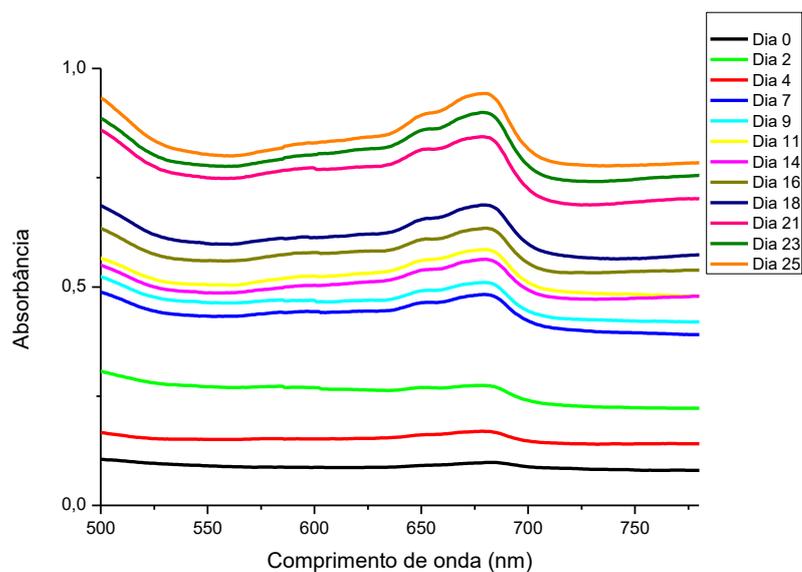
Figura 19 - Fotografia de amostra no 21º dia de cultivo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de comprimento de onda encontrado no presente trabalho é muito próximo ao da literatura, e de acordo com Hersh e Crumpton (1987) e Fargasová (1996), estão associados a concentrações de pigmentos clorofilados, que possuem valor de leitura em torno de 664 nm. Pepino (2013) em seu estudo do crescimento da microalga *Scenedesmus MJ13*, encontrou um comprimento de onda ótimo de 681 nm na varredura no espectro da região do UV-vis.

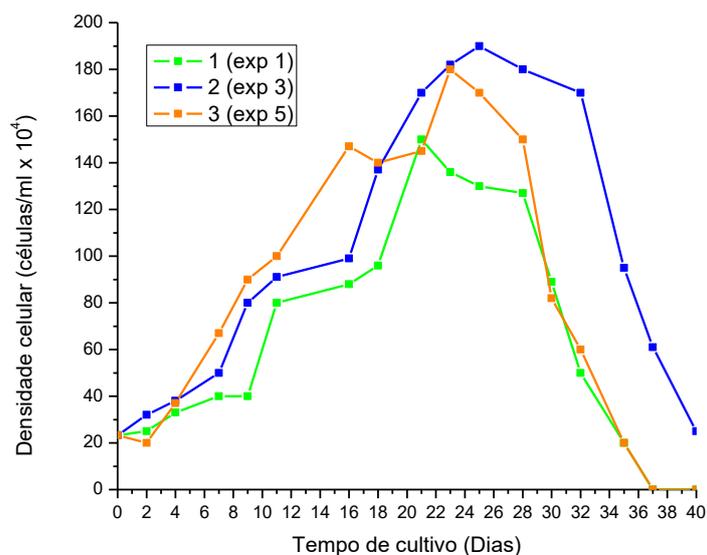
Figura 20 - Varredura de comprimento de onda realizada no experimento 03, dias 0 a 25.



Fonte: Elaborado pelo autor.

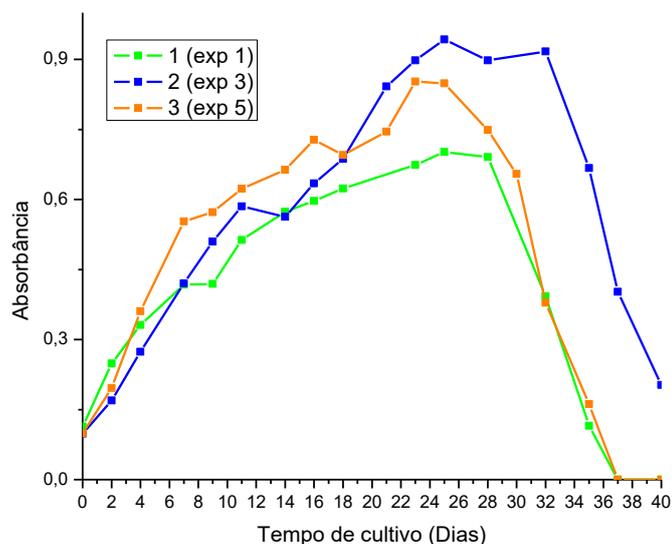
Na Figura 21 é possível visualizar o comportamento da curva de crescimento de *Nannochloropsis oculata* em relação a densidade celular medida em microscópio, ao passo que a Figura 22 mostra este comportamento em relação a absorbância em 681 nm obtidas no espectrofotômetro UV-vis.

Figura 21 - Curva de crescimento de *Nannochloropsis oculata* em relação a densidade celular.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Curva de crescimento de *Nannochloropsis oculata* em relação a absorvância.

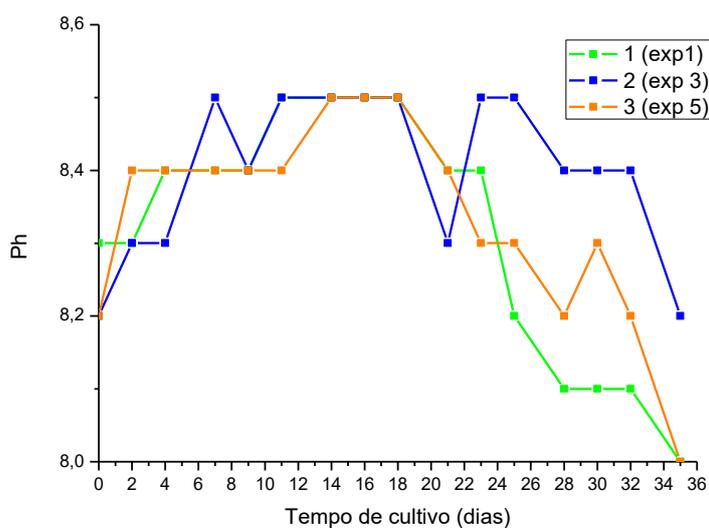


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se a presença de fases de crescimento celular bem definidas. A densidade máxima celular ocorre entre os dias 21 a 27. Observa-se também, uma grande semelhança entre as curvas de crescimento em função da densidade celular com as curvas em função da absorvância.

Por meio da Figura 23 é possível visualizar a relação do tempo de cultivo em função do pH.

Figura 23 - Tempo de cultivo em função do pH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se que os valores de pH obtidos experimentalmente durante todo o cultivo estão na faixa de 8,0 - 8,5, dentro da faixa ideal, uma vez que se sabe que o meio alcalino (pH 7 – 9) é benéfico para o crescimento de algas verdes de água salgada (RAZZAK et al., 2013).

Através da Tabela 8, observam-se os valores médios encontrados para os parâmetros de crescimento.

Tabela 8 - Valores médios dos parâmetros de crescimento.

Parâmetros de crescimento	Média	Desvio
μ (dia ⁻¹)	0,671	0,007
K (dia ⁻¹)	0,137	0,009
Densidade máxima (células.mL ⁻¹ x 10 ⁴)	173,333	20,817

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros de crescimento obtidos foram considerados como os valores correspondentes da condição de controle (ou padrão) e servem como referência para comparação com outras condições de cultivo.

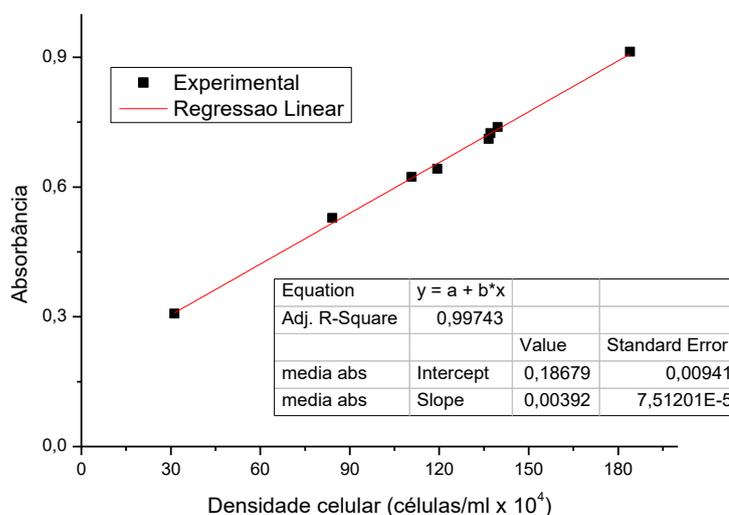
Os valores dos parâmetros de crescimento obtidos foram satisfatórios, levando-se em conta os valores citados na literatura:

- Issarapayup et al. (2009), propuseram um sistema alternativo para cultivo de *Haematococcus pluvialis* que foi um fotobiorreator airlift tipo placa plana. Neste trabalho, foram analisados alguns parâmetros, obtendo-se uma densidade celular máxima de $4,1 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e uma taxa específica de crescimento de 0,52 dia⁻¹.
- Arriada (2014) obteve taxa de crescimento da microalga *N. oculata* aclimatada maiores que a microalga não aclimatada, atingindo 0,22 dia⁻¹.

5.5. Determinação do crescimento celular por espectroscopia UV-vis.

Após a obtenção dos dados pelo cultivo padrão, traçou-se os pontos da densidade celular em função da absorbância, envolvendo seus valores médios. Em seguida realizou-se o ajuste linear, obtendo-se a curva de calibração (equação da reta), conforme a Figura 24.

Figura 24 - Curva de calibração (padrão) de crescimento de *Nannochloropsis oculata*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir do ajuste linear da curva (absorbância x concentração), obteve-se um $R^2 = 0,997$, indicando que os dados estão bem ajustados a linearização e de acordo com a lei de Beer-Lambert, que afirma que a absorbância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie (ALMEIDA; SILVA, 2018).

Geis et al. (2000), em seus experimentos com determinação do crescimento algal, concluíram que a fluorescência e a absorbância apresentam menor coeficiente de variação do que resultados determinados por contagem celular em microscópio.

Nota-se que é possível utilizar a curva de calibração para estimar rapidamente o crescimento celular da espécie de microalga *Nannochloropsis oculata*, conforme a Equação 14.

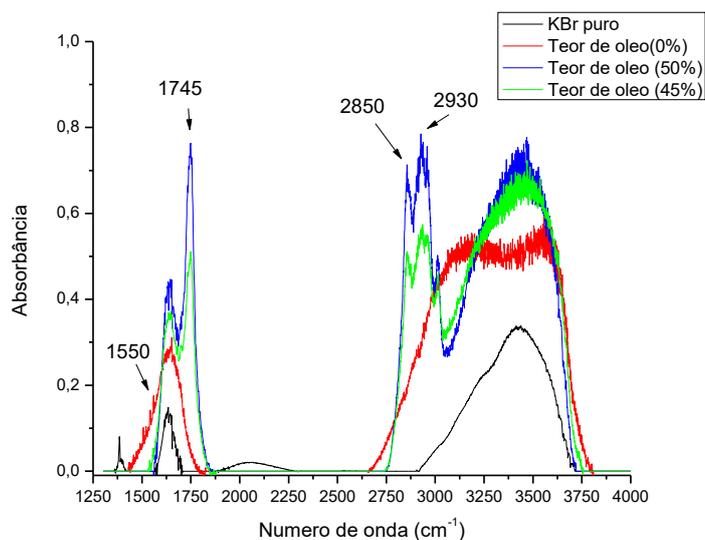
$$ABS = 0,00392(X) + 0,18679 \quad (14)$$

Em que, ABS=Absorbância e X= densidade celular (células.mL⁻¹ x 10⁻⁴).

5.6. Determinação do teor de bio-óleo por infravermelho

Com o objetivo de se verificar a não interferência do KBr e do solvente (meio de cultivo) nos picos referentes ao teor de bio-óleo, foi elaborada a Figura 25. Para facilitar a comparação, foram traçadas linhas de base em todos os espectros analisados.

Figura 25 - Espectros no infravermelho do KBr puro e teores de bio-óleo (0%, 45% e 50%).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O resultado do espectro infravermelho contém uma variedade de bandas que podem indicar diferentes grupos funcionais presentes no material em estudo, deste modo, foi elaborado o Quadro 5 (STEVENSON, 1994; SILVERSTEIN et. al., 1994).

Quadro 5 - Identificação de grupos funcionais por FTIR

Picos (cm ⁻¹)	Identificação
3500 a 3000	Correspondem ao alongamento O-H.
2930 a 2858	Correspondem a CH ₂ e CH ₃ de lipídios.
1745	Estiramento vibracional C=O de grupo funcional éster de lipídios.
1300 a 1550	Absorção de CH ₂ e CH ₃ de vibração angular de lipídios e proteínas.

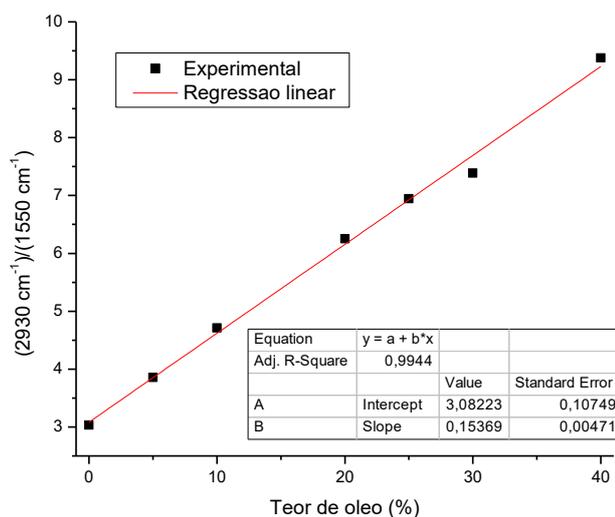
Fonte: Adaptado de (NAUMANN, 2000; BARBOSA, 2008; BALOYI, 2012).

Nota-se que não há interferência do KBr e do meio de cultivo (representado pelo teor de bio-óleo 0%) nos picos correspondentes aos lipídios, uma vez que não apresentam picos definidos na região de 2930 a 2858 cm⁻¹, 1745 e 1550 cm⁻¹. A diferença entre o espectro do KBr puro em relação ao KBr com o meio de cultivo puro (0%), pode estar relacionada a absorção de água. O aumento do pico de 3500 a 3000 cm⁻¹, reforça essa evidência, por ser o principal componente do meio de cultivo.

Observou-se também picos em 2930 e 1745 cm⁻¹ maiores para a solução com teor de bio-óleo de 50 % em relação a de 45 %. Tal fato, evidencia a grande

sensibilidade dos picos com a porcentagem de bio-óleo presente. Diante disso, foi realizada a correlação linear entre os teores de bio-óleo e a razão das intensidades dos sinais de FTIR em $2930\text{ cm}^{-1}/1550\text{ cm}^{-1}$ (Figura 26).

Figura 26 - Correlação linear do teor de bio-óleo com sinais FTIR ($2930\text{ cm}^{-1}/1550\text{ cm}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O ajuste linear da curva apresentou um $R^2 = 0,994$, indicando que a linearização é satisfatória. Assim, é possível utilizar a curva de calibração para estimar o teor de bio-óleo (%) de cultivos da espécie de microalga *Nannochloropsis oculata*, conforme a Equação 15.

$$SFTIR = 0,1536(T) + 3,0822 \quad (15)$$

Em que, $SFTIR$ = Sinal em FTIR e T = teor de bio-óleo (%).

A técnica de FTIR mostra-se versátil, prática, utiliza-se pouca quantidade de amostra, com maior rapidez na obtenção dos resultados em um processo de prospecção de microalgas (PEPINO, 2013).

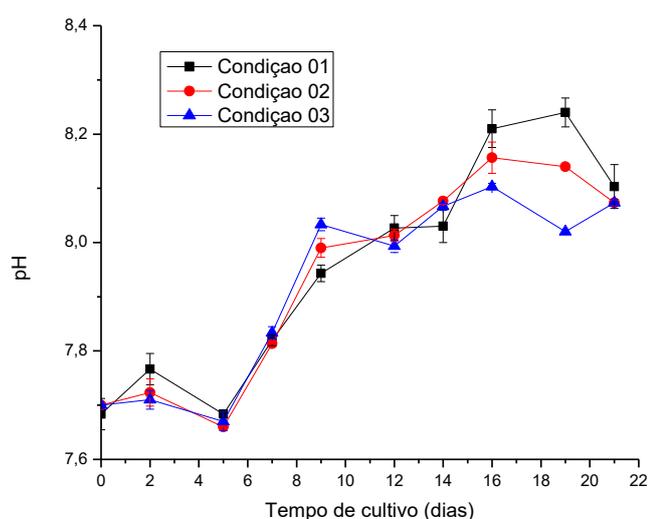
5.7. Análise das condições de luminosidade no crescimento microalgal.

5.7.1. Abordagem Experimental

Os cultivos para cada condição de luminosidade, foram conduzidos até o início da fase estacionária, determinada como sendo 21 dias de cultivo.

Na Figura 27 visualiza-se o comportamento da relação do tempo de cultivo em função do pH para cada condição de luminosidade estudada. Nota-se que os valores de pH medidos durante o cultivo estavam na faixa de 7,6 - 8,3, dentro da faixa ideal de operação. Observa-se, também, que o comportamento entre as condições de luminosidade estudadas foi similar.

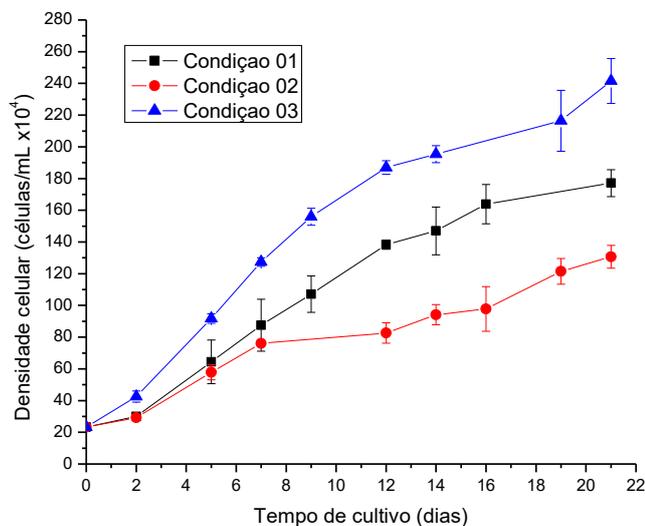
Figura 27 - Tempo de cultivo em função do pH para cada condição de luminosidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 28 e a Tabela 9 apresentam o comportamento das curvas de crescimento experimentais de *Nannochloropsis oculata* e os parâmetros de crescimento experimentais para as condições de luminosidade 01, 02 e 03.

Figura 28 - Curva de crescimento experimental para cada condição de luminosidade estudada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 - Parâmetros de crescimento experimentais para condições de luminosidade.

Parâmetros de crescimento	Condição 01		Condição 02		Condição 03	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
μ (dia ⁻¹)	0,678	0,003	0,661	0,008	0,695	0,007
K (dia ⁻¹)	0,139	0,003	0,118	0,009	0,160	0,010
Densidade máxima (células.mL ⁻¹ x 10 ⁴)	177,113	8,430	130,666	7,228	241,527	14,128

Fonte: Elaborado pelo autor.

A condição 03 (12_h luz: 12_h escuro) apresenta-se como a melhor condição de luminosidade, para cultivo de microalgas *Nannochloropsis oculata*, com maior densidade celular ao início da fase estacionária. Este resultado pode ser explicado devido as mudanças na fisiologia celular. Uma maior exposição a luz pode gerar uma quantidade menor de biomassa, devido a produção de substâncias tóxicas pela clorofila em seu estado excitado e a tendência das células de produzir novos pigmentos, o que retarda o crescimento (GALVÃO, 2011).

Destaca-se ainda que a condição 03 apresentou valores dos parâmetros de crescimento superiores a condição de controle (Tabela 8), que é semelhante a condição 01 (24_h luz: 00_h escuro).

Zhang et. al. (2009) observaram que, se a alta exposição a 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.

Resultados descritos por Boussiba e Vonshak (1991) e Zhang et. al. (2009) atestaram que ocorre um aumento no acúmulo de astaxantina em altas exposições de luminosidade, causado por mudanças do metabolismo celular. De fato, a alta exposição a luminosidade gera uma tendência das células a produzirem novos pigmentos, com o intuito de capturar a luminosidade excedente, como é o caso da astaxantina. Isto implica em uma alteração no crescimento das microalgas diminuindo a produção de biomassa final.

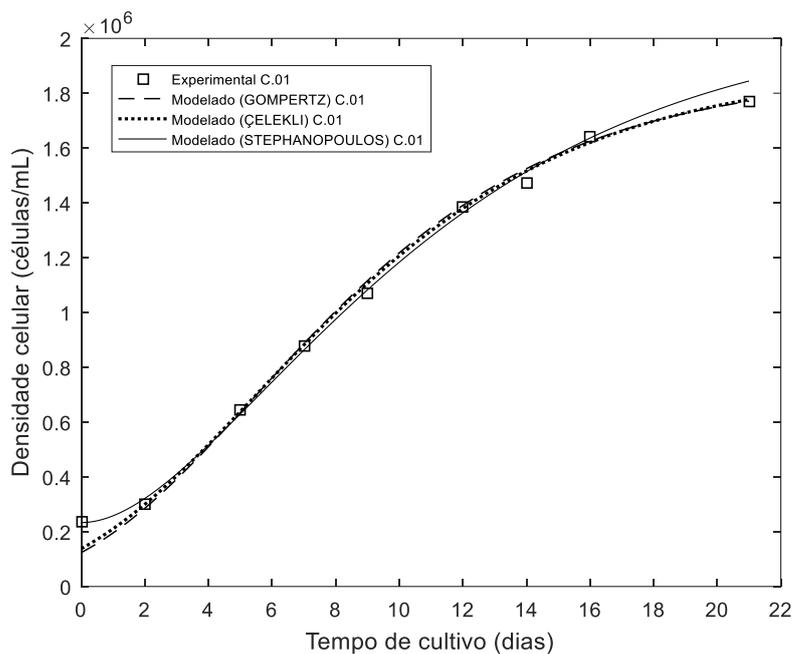
Dominguez-Bocanegra et. al. (2007) observaram que quando a baixa exposição a luz é mantida constante, geralmente, não é suficiente para o acúmulo da astaxantina. É compreensível a utilização de uma menor exposição luminosa para priorizar tanto células vegetativas em crescimento, quanto o acúmulo gradual de astaxantina no interior das células.

5.7.2. Modelagem matemática

As Figuras 45 a 53, do APÊNDICE, apresentam os dados experimentais e o ajuste para obtenção dos parâmetros de cada modelo nas condições de luminosidade estudadas. O tempo morto foi considerado como aproximadamente zero (dias), uma vez que se constatou um tempo morto experimental de poucas horas.

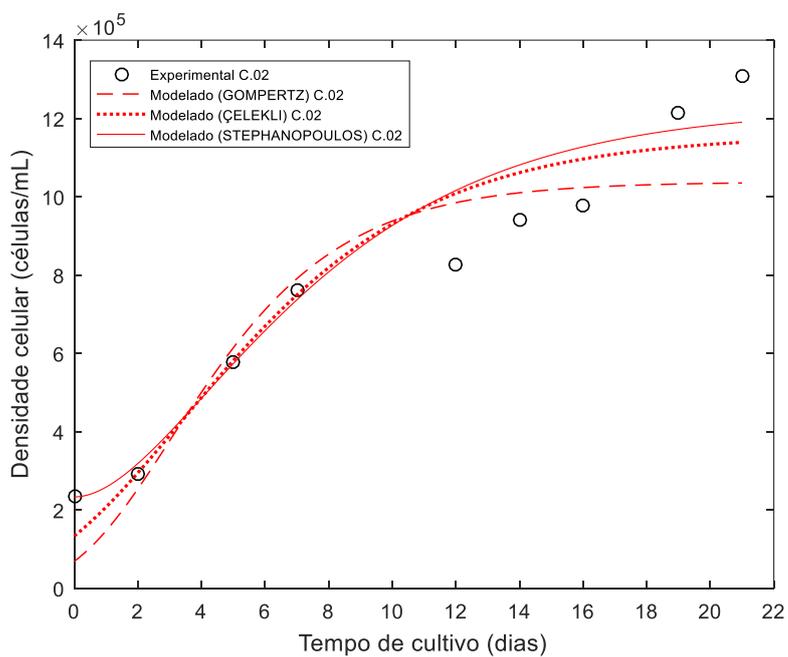
Após a obtenção dos parâmetros, seguiu-se para a modelagem em *Matlab*®. As Figuras 29, 30 e 31 apresentam os dados experimentais e modelados, em cada condição de luminosidade estudada. Foram também calculados os desvios entre a densidade celular modelada e a experimental.

Figura 29 - Curvas de crescimento modeladas, Condição 01.



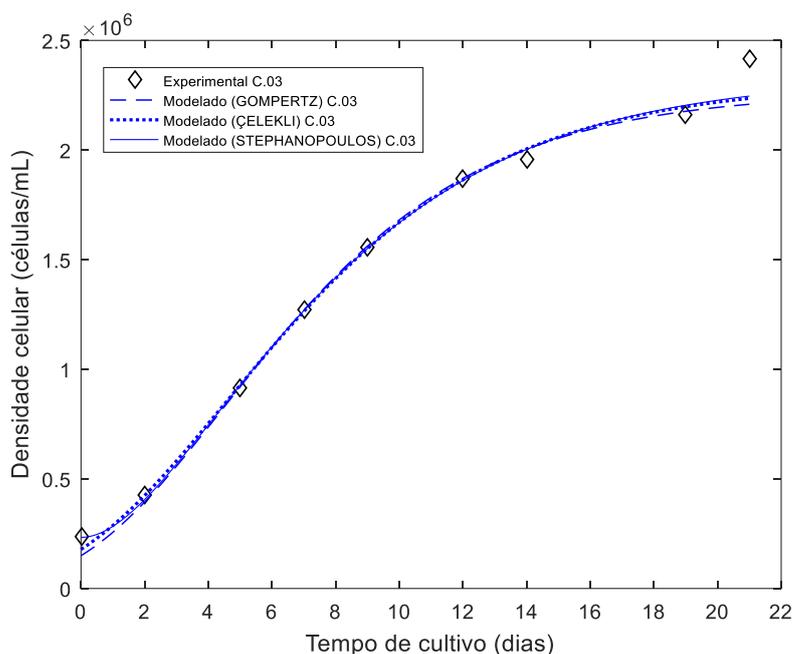
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 - Curvas de crescimento modeladas, Condição 02.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 - Curvas de crescimento modeladas, Condição 03.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Tabela 10 é possível visualizar os valores dos parâmetros, coeficientes de correlação e desvios obtidos pelos modelos estudados.

Tabela 10 - Valores obtidos através do ajuste e modelagem.

		Condição 01	Condição 02	Condição 03
Modelo de Gompertz	W	$1,875 \times 10^6$	$1,038 \times 10^6$	$2,268 \times 10^6$
	U	$1,269 \times 10^5$	$1,255 \times 10^5$	$1,840 \times 10^5$
	tm (dias)	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	R ²	0,999	0,946	0,996
	Desvio (%)	7,085	17,879	6,163
Modelo de Çelekli	a	$9,486 \times 10^5$	$5,797 \times 10^5$	$1,156 \times 10^6$
	b	$5,929 \times 10^4$	$3,623 \times 10^4$	$7,225 \times 10^4$
	c	$6,391 \times 10^4$	$-7,906 \times 10^4$	$8,832 \times 10^4$
	d	$3,666 \times 10^3$	$1,103 \times 10^4$	$5,451 \times 10^3$
	e	-0,104	-0,500	-0,143
	f	-0,006	-0,031	-0,009
	F (mg.L ⁻¹)	16	16	16
	R ²	0,999	0,929	0,991
	Desvio (%)	5,616	12,522	4,237
Modelo de Stephanopoulos	A	$1,833 \times 10^6$	$9,942 \times 10^5$	$2,100 \times 10^6$
	B	5,757	4,121	4,232
	tm (dias)	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	R ²	0,997	0,972	0,997
	Desvio (%)	2,297	8,735	2,059

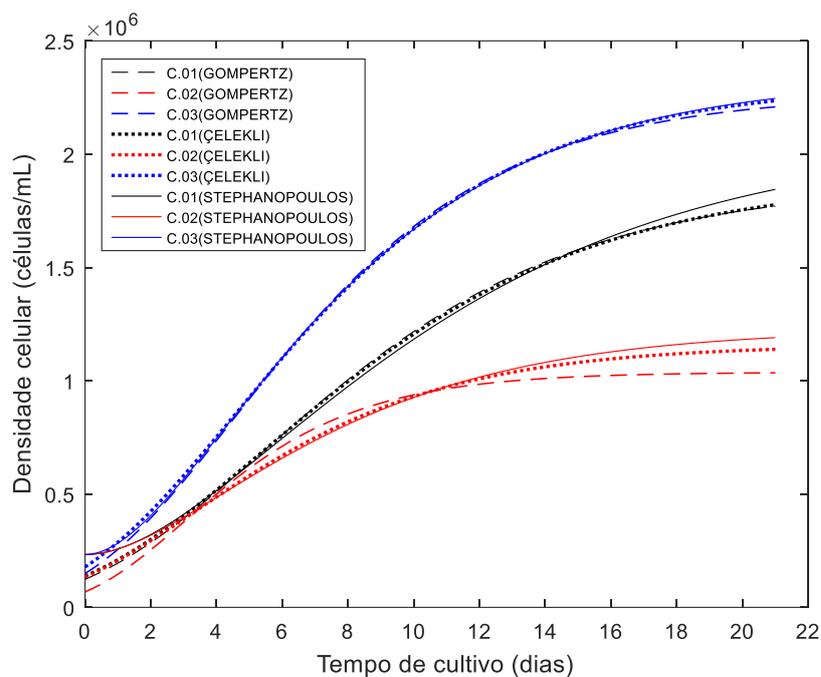
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se que os modelos estudados descrevem de forma satisfatória o crescimento da biomassa para as condições de luminosidade 01 e 03, com coeficientes de correlação de 0,999 a 0,991. Porém, o modelo de Stephanopoulos foi o que apresentou menores desvios em relação aos dados experimentais.

Para prever o crescimento da biomassa na condição de luminosidade 02, os modelos estudados apresentaram desvios elevados e coeficientes de correlação inferiores a 0,972.

Por meio das curvas dos modelos foi possível calcular os parâmetros de crescimento modelados e prever qual condição de luminosidade otimiza a produção de biomassa, conforme evidenciadas na Figura 32 e na Tabela 11.

Figura 32 - Curvas de crescimento modeladas para C.01, C.02 e C.03.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11 - Parâmetros de crescimento modelados para condições de luminosidade.

	Parâmetros de crescimento	Condição 01	Condição 02	Condição 03
Modelo de Gompertz	μ (dia ⁻¹)	0,682	0,656	0,692
	K (dia ⁻¹)	0,183	0,187	0,185
	Densidade máxima (células.mL ⁻¹ x 10 ⁴)	177,090	103,510	220,870
	Parâmetros de crescimento	Condição 01	Condição 02	Condição 03
Modelo de Çelekli	μ (dia ⁻¹)	0,681	0,658	0,692
	K (dia ⁻¹)	0,176	0,147	0,174
	Densidade máxima (células.mL ⁻¹ x 10 ⁴)	177,680	113,890	223,550
	Parâmetros de crescimento	Condição 01	Condição 02	Condição 03
Modelo de Stephanopoulos	μ (dia ⁻¹)	0,681	0,656	0,691
	K (dia ⁻¹)	0,142	0,112	0,156
	Densidade máxima (células.mL ⁻¹ x 10 ⁴)	184,460	119,040	224,600

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as condições de luminosidade previstas, percebe-se que a condição 03 (12_h luz: 12_h escuro) foi a que apresentou a maior produção de biomassa, corroborando com os resultados obtidos experimentalmente. O modelo de Stephanopoulos prediz que a densidade máxima foi de 224,600 x 10⁴ células.mL⁻¹.

Galvão (2011) em seu estudo de modelagem da biomassa da microalga *Haematococcus Pluvialis* em meio de cultura Rudic, encontrou uma produção de biomassa de 110 x 10³ células.mL⁻¹ no 21^o dia de cultivo, em uma intensidade luminosa de 4000 lux. O autor constatou que ocorre uma redução da produção de biomassa final para as intensidades de luz de 3000 a 5000 lux.

5.7.3. Teores de bio-óleo

A Tabela 12 especifica os valores obtidos das razões dos picos em FTIR para a análise qualitativa e o teor de bio-óleo estimado para cada condição de luminosidade estudada, utilizando-se a curva de calibração.

Sabe-se que os ácidos graxos têm fórmula CH₃-(CH₂)_n-C=OR. Deste modo, infere-se que se a razão CH₂/CH₃ apresenta valores mais altos, à medida que cadeias alifáticas se tornem maiores ou menos ramificadas (PEPINO, 2013).

Comparando-se as intensidades da razão $I_{2850}(\text{CH}_2)/I_{2875}(\text{CH}_3)$, para as condições de luminosidade apresentadas na Tabela 12, observa-se que a condição 03 apresenta um aumento da cadeia carbônica e diminuição dos números de ramificações, quando comparada com as condições estudadas.

Tabela 12 - Teores de bio-óleo e razão obtidos por FTIR.

Condição de luminosidade	Teor de Bio-óleo (%)		2850 $\text{cm}^{-1}/2875 \text{ cm}^{-1}$
	Média	Desvio	Razão $I_{2850} \text{ CH}_2/I_{2875} \text{ CH}_3$
01	15,297	2,157	0,808
02	6,690	1,722	0,462
03	20,019	0,079	1,081

Fonte: Elaborado pelo autor.

Este tipo de análise é interessante para estimar o grau de saturação das cadeias carbônicas, relacionadas ao estudo da produção lipídica de microalgas. Assim, é possível obter um método de comparação das respostas fisiológicas apresentadas pelas microalgas na biossíntese de lipídios para cada tratamento estudado. Óleos com alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados são indesejáveis para uso como combustível, devido à sua baixa estabilidade química, em relação aos ácidos graxos monoinsaturados ou saturados (PEPINO, 2013).

O número de cetanos também aumenta com o comprimento da cadeia carbônica não ramificada. Ele é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo diesel, logo, reflete a qualidade da ignição do combustível. Quanto maior o número de cetanos mais curto será o tempo de ignição (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Lin e Ritz (1993) demonstraram através do FTIR na proporção CH_2/CH_3 , analisando suas intensidades, o efeito da mudança do comprimento da cadeia carbônica usando uma série de n-alcenos conhecidos.

Em relação a análise quantitativa do teor de bio-óleo, nota-se a relação direta entre a densidade celular e o teor de bio-óleo obtido. Consequentemente, dentre as condições estudadas, a condição de luminosidade 03 foi a condição que apresentou o maior valor para o teor de bio-óleo percentual, aproximadamente 20%.

Os resultados confirmam que as condições de cultivo podem alterar a quantidade de bio-óleo produzido, mas também a qualidade deste bio-óleo, uma vez que, parte da biossíntese das moléculas de microalgas está associada às condições ambientais,

principalmente àquelas relacionadas ao estresse que alterem a citocinese do organismo (SATO et. al., 2000; HU, 2008).

5.7.4. Redução de gastos energéticos com luminosidade no cultivo microalgal

A Tabela 13 detalha os gastos de luminosidade para os cultivos estudados, em comparação com a condição de controle (24_h luz: 00_h escuro).

Tabela 13 - Comparação de gastos entre cultivos estudados e condição de controle.

	Controle (C. 1) (24_h luz: 00_h escuro)	Condição 2 (24_h luz: 24_h escuro)	Condição 3 (12_h luz: 12_h escuro)
DMC (cel.ml ⁻¹ x 10 ⁴)	177,113	130,666	241,527
Teor de Bio-óleo (%)	15,297	6,690	20,019
Gasto Luminosidade (por cultivo)	60,48 KWh	30,24 KWh	30,24 KWh
Gasto Luminosidade (por litro)	1,12 KWh/ (L de cultivo)	0,56 KWh/ (L de cultivo)	0,56 KWh/ (L de cultivo)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se que o cultivo nas condições de 12_h luz: 12_h escuro é mais vantajoso. Uma vez que este apresenta uma redução de 0,56 KWh para cada litro de cultivo, com valores de DMC e teor de bio-óleo superiores a condição de controle. A condição 24_h luz: 24_h escuro, apesar de gerar uma economia de 0,56 KWh por litro de cultivo, não se mostra vantajosa, devido ao baixo teor de bio-óleo e DMC encontrados. Este resultado também é promissor para o cultivo de microalgas em sistemas abertos, em que a iluminação solar ocorre aproximadamente na faixa de 12_h luz: 12_h escuro.

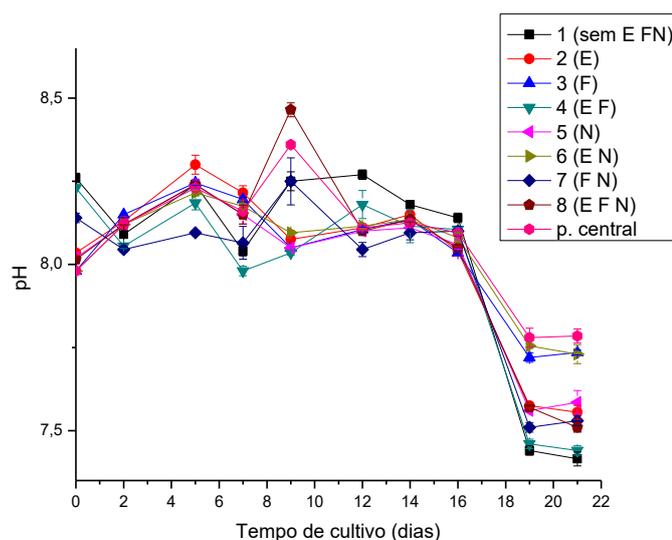
5.8. Análise do uso de estruvita como nutriente

A condição 12_h luz: 12_h escuro foi fixada, devido ao possível alcance do maior potencial biomássico encontrado na etapa de crescimento celular. Dessa forma preparou-se uma solução de estruvita com concentração de 18,312 g.L⁻¹, respeitando-se o cálculo estequiométrico em relação ao fósforo, para utilização na proporção de 1 mL de solução para cada 1 L de cultivo, conforme tabela de planejamento experimental.

5.8.1. Curva de crescimento, parâmetros e teores de bio-óleo

Na Figura 33 é possível visualizar a relação do tempo de cultivo em função do pH. Nota-se que os valores de pH obtidos experimentalmente durante os cultivos estão na faixa de 7,25 - 8,50, ou seja, dentro da faixa ideal de operação.

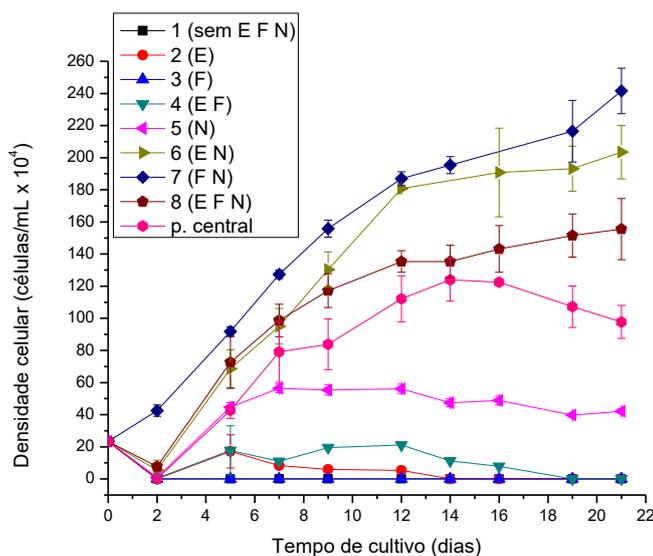
Figura 33 - Tempo de cultivo em função do pH para os ensaios do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 34 visualizam-se os comportamentos das curvas de crescimento experimentais de *Nannochloropsis oculata*. Verificou-se que os cultivos, de modo geral, apresentaram uma fase lag bem definida, caracterizada pela adaptação celular frente a adição de uma nova fonte de nutriente, à estruvita. A exceção ficou acerca do ensaio 7, que foi alimentado com os nutrientes que já vinham sendo utilizados nas cepas.

Figura 34 - Curva de crescimento experimental para cada ensaio.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Tabela 14 encontram-se os valores dos parâmetros de crescimento experimentais, teores de bio-óleo e a razão CH_2/CH_3 para cada ensaio realizado. Nota-se que os ensaios 1, ao 4 não apresentaram crescimento celular significativo, conseqüentemente não se produziu valores consideráveis para os teores de bio-óleo.

Tabela 14 - Parâmetros de crescimento experimentais, teores de bio-óleo e razão por FTIR.

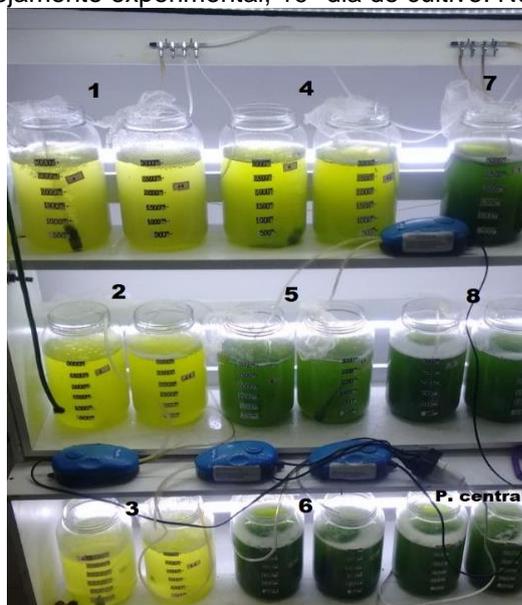
Ensaio	μ (dia ⁻¹)		K (dia ⁻¹)		DMC (cel.mL ⁻¹ x 10 ⁴)		Teor de Bio-óleo (%)		I_{2850}/I_{2875}
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Razão
01	0	0	0	0	23,330	0	0	0	-
02	0	0	0	0	23,869	0,762	0	0	-
03	0	0	0	0	23,330	0	0	0	-
04	0	0	0	0	25,947	3,700	0	0	-
05	0,578	0,004	0,041	0,002	57,874	0,482	0,970	0,241	0,474
06	0,686	0,007	0,149	0,009	203,437	16,575	16,433	2,262	1,163
07	0,695	0,007	0,160	0,010	241,527	14,128	20,019	0,079	1,081
08	0,671	0,007	0,130	0,008	155,539	19,056	7,544	1,067	0,368
Ponto Central	0,643	0,013	0,098	0,014	97,772	10,198	4,405	1,837	0,290

Fonte: Elaborado pelo autor.

Este fato pode ter ocorrido pela carência de nutrientes como fonte de fósforo e nitrogênio no ensaio 1, e de fontes de nitrogênio nos ensaios 2, 3 e 4. Estes cultivos

adquiriram uma coloração amarelada, que está relacionada a morte celular, e pode ser visualizada pela Figura 35.

Figura 35 - Cultivos do planejamento experimental, 19º dia de cultivo. Numeração conforme Tabela 4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Percebe-se no ensaio 5 a importância da fonte de nitrogênio, que mesmo com a carência total de fontes de fósforo, gerou um leve crescimento celular. Porém, os resultados estimados para as variáveis respostas foram baixíssimos.

Os ensaios 6, 7, 8 e do ponto central geraram um crescimento celular mais acentuado. Nota-se que o ensaio 6 (estruvita com nitrato) possui valores dos parâmetros de crescimento e variáveis respostas próximos as do ensaio 7 (fosfato e nitrato), destacando-se a densidade máxima celular de $203,437 \times 10^4$ células.mL⁻¹ e teor de bio-óleo de 16,433%. Isso sugere a eficácia do uso de estruvita como nutriente em um cultivo microalgal, sobretudo como fonte de fósforo, em substituição as fontes convencionais.

Os resultados obtidos pelo ensaio 8, mostram que o excesso de nutrientes como fontes de fósforo (estruvita e fosfato), torna-se prejudicial ao cultivo, gerando valores dos parâmetros de crescimento e variáveis respostas inferiores às dos ensaios 6 e 7.

Os resultados do ponto central, evidenciam a importância do nitrogênio como nutriente, pois mesmo sem o excesso de fonte de fósforo, a carência de nitrogênio gerou valores dos parâmetros de crescimento e variáveis respostas inferiores ao ensaio 8.

Comparando-se as intensidades da razão $I_{2850}(\text{CH}_2)/I_{2875}(\text{CH}_3)$, dos ensaios apresentados na Tabela 14, observa-se que os ensaios 6 e 7 apresentaram um aumento da cadeia carbônica e diminuição dos números de ramificações, quando comparados com as demais condições estudadas, que possuem situações de estresse nutricional acentuadas.

5.8.2. Análise do Planejamento experimental

Na Tabela 15, estão registrados na tabela de planejamento de experimentos 2^3 , os valores das variáveis respostas densidade celular máxima (DMC) e teor de bio-óleo (%), com réplicas.

Tabela 15 - Planejamento de experimental 2^3 .

Ensaio	Estruvita (mL/L de cultivo)	Fosfato (mL/L de cultivo)	Nitrato (mL/L de cultivo)	DMC (cel.mL ⁻¹ x 10 ⁴)	Teor de Bio- óleo (%)
01	0	0	0	23,333	0
02	1	0	0	23,333	0
03	0	1	0	23,333	0
04	1	1	0	23,333	0
05	0	0	1	58,216	0,8
06	1	0	1	222,228	18,032
07	0	1	1	265,659	20,075
08	1	1	1	169,014	8,299
09	0,5	0,5	0,5	112,055	5,704
01 R	0	0	0	23,333	0
02 R	1	0	0	24,407	0
03 R	0	1	0	23,333	0
04 R	1	1	0	28,563	0
05 R	0	0	1	57,533	1,141
06 R	1	0	1	184,646	14,833
07 R	0	1	1	217,395	19,963
08 R	1	1	1	142,064	6,79
09 R	0,5	0,5	0,5	83,491	3,106

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise estatística do planejamento experimental foi elaborada mediante emprego do teste de hipótese, utilizando-se a distribuição *t-student* com nível de significância de 5%. Optou-se pela ANOVA three-way interactions para estudar a relação entre os 3 fatores. Observa-se na Tabela 16 os efeitos encontrados pelas variáveis respostas estudadas.

Tabela 16 - Tabela de Efeitos.

Variável Resposta	Fator	Efeito	t(7)	p-valor
DMC R ² =0,991	Média	96,707	32,660	0,000
	Curvatura	2,133	0,132	0,898
	N	145,171	24,514	0,000
	F	29,760	5,025	0,002
	E	20,379	3,441	0,011
	NxF	28,721	4,850	0,002
	NxE	18,803	3,175	0,016
	FxE	-62,066	-10,480	0,000
	NxFxE	-63,105	-10,656	0,000
Variável Resposta	Fator	Efeito	t(7)	p-valor
Teor de Bio-óleo R ² =0,993	Média	5,821	25,769	0,000
	Curvatura	-2,832	-2,304	0,055
	N	11,642	25,769	0,000
	F	2,140	4,738	0,002
	E	1,147	2,538	0,039
	NxF	2,140	4,738	0,002
	NxE	1,147	2,538	0,039
	FxE	-7,384	-16,345	0,000
	NxFxE	-7,384	-16,345	0,000

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se que a curvatura não foi significativa e os demais termos foram significativos para o modelo (p-valor inferior a 0,05). Os efeitos de interação de FxE e NxFxE apresentaram uma influência negativa nas variáveis respostas estudadas, ocasionado devido ao excesso de fontes de fósforo como nutriente. O efeito linear do nutriente nitrato foi o que apresentou maior influência positiva nas variáveis respostas

estudadas. Esse resultado indica que o nitrogênio é o nutriente limitante à produção de biomassa microalgal. De fato, alguns estudos têm mostrado que a limitação de nitrogênio reduz o crescimento microalgal. Fortier e Sturm (2012), citam que a biomassa microalgácea tem composição típica de $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$, portanto, exigência com relação 16N:1P, contudo a relação N:P na biomassa algácea pode variar de 4:1 para quase 40:1, dependendo da espécie e da disponibilidade de nutrientes (CHISTI, 2007).

Foram obtidos os coeficientes de regressão do modelo matemático para cada variável resposta. Deste modo, gerou-se as equações dos modelos estatísticos codificados, que podem ser visualizadas pela Tabela 17.

Tabela 17 - Equação do modelo matemático.

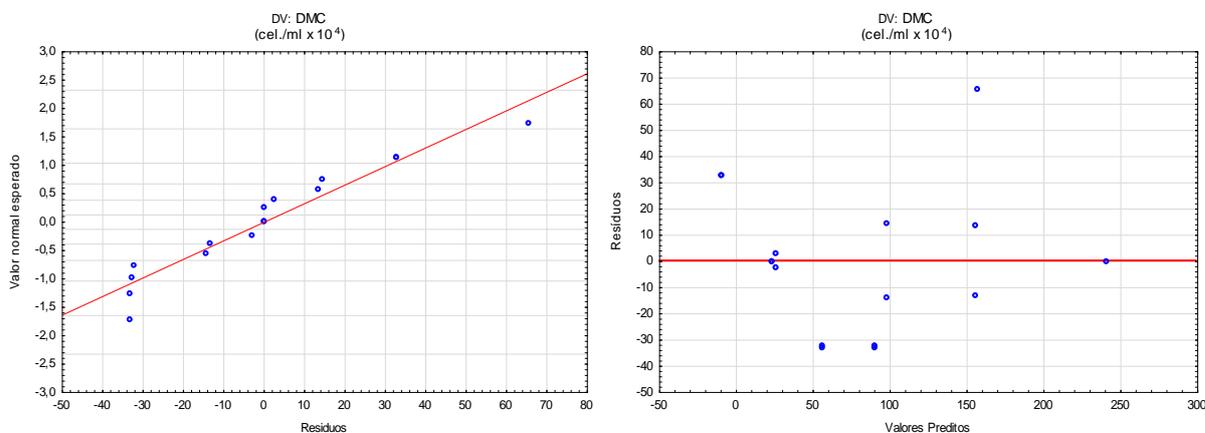
Variável Resposta	Equação	Validade
DMC $R^2=0,991$	$96,707 +72,586N +14,880F +10,190E$ $+14,361NF +9,402NE -31,033FE$ $-31,552NFE$	$-1 < N < +1$ $-1 < F < +1$ $-1 < E < +1$
Teor de Bio-óleo $R^2=0,993$	$5,821 +5,821N +1,070F +0,573E$ $+1,070NF +0,573NE -3,692FE$ $-3,692NFE$	$-1 < N < +1$ $-1 < F < +1$ $-1 < E < +1$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que os valores dos coeficientes de correlação (R^2) indicam que 99,1% e 99,3% dos dados experimentais ajustam-se as equações dos modelos estatísticos de DMC e teor de bio-óleo, respectivamente.

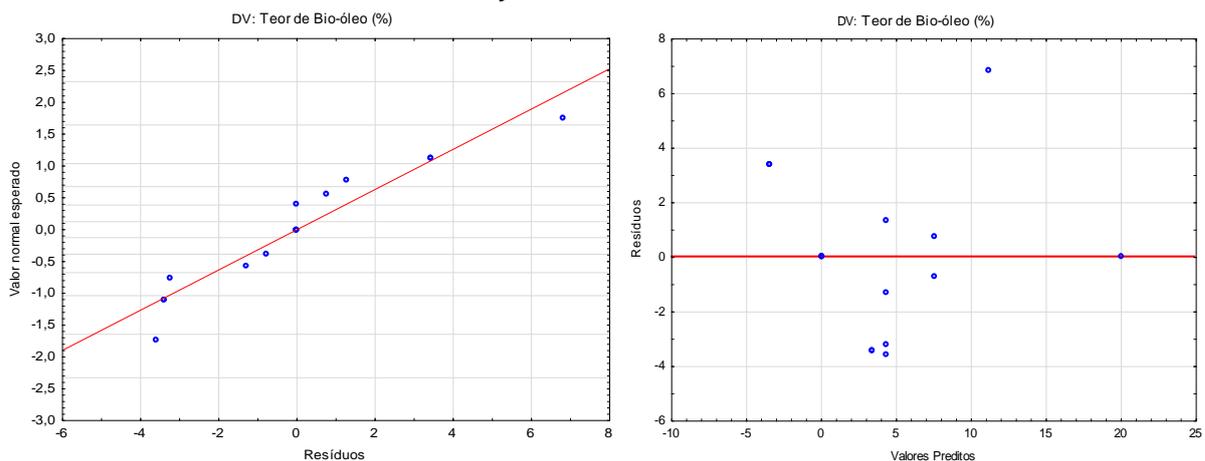
Nas Figuras 36 e 37, verifica-se as análises de resíduos dos modelos quanto à probabilidade normal e distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos, para as variáveis respostas DMC e teor de bio-óleo, respectivamente. Observa-se a normalidade dos resíduos, através da proximidade dos pontos experimentais com a linha contínua, e independência dos resíduos, visto que os pontos se encontram aleatórios em torno da reta de resíduo nulo.

Figura 36 – Variável resposta DMC. Probabilidade normal dos resíduos à esquerda e distribuição dos resíduos à direita.



Fonte: Elaborado pelo autor.

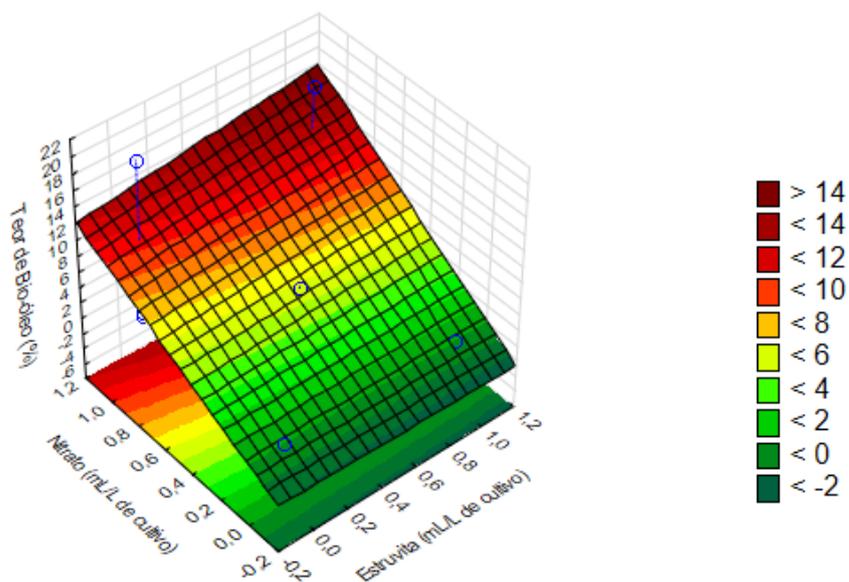
Figura 37 - Variável resposta Teor de bio-óleo. Probabilidade normal dos resíduos à esquerda e distribuição dos resíduos à direita.



Fonte: Elaborado pelo autor.

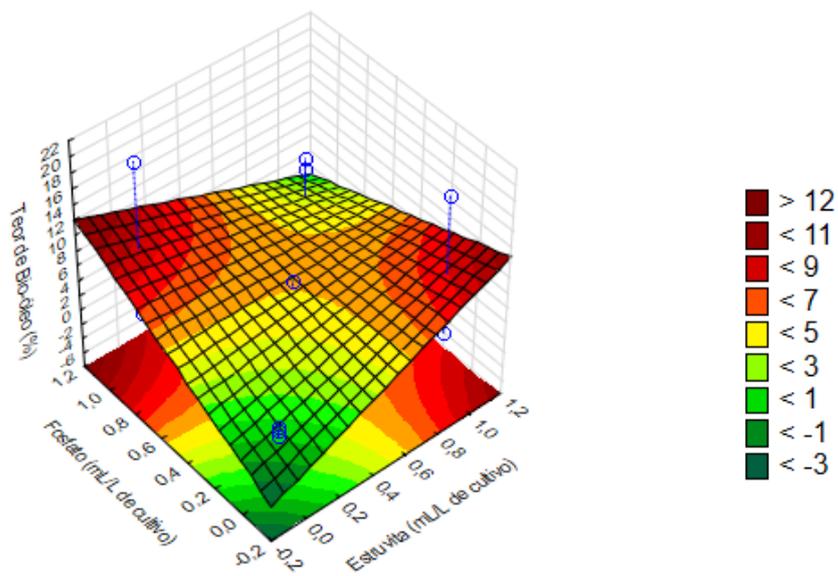
Verifica-se nas Figuras 38, 39 e 40 o comportamento das superfícies de respostas correlacionando os fatores não codificados estudados, para variável resposta teor de bio-óleo. As superfícies obtidas pela variável resposta DMC podem ser visualizadas no APÊNDICE (Figuras 54, 55 e 56). Observou-se uma grande semelhança entre as superfícies das variáveis respostas, o que evidência a relação entre a densidade celular e o teor de bio-óleo obtido.

Figura 38 - Superfície de resposta: Estruvita x Nitrato para Teor de Bio-óleo.
DV: Teor de Bio-óleo (%)



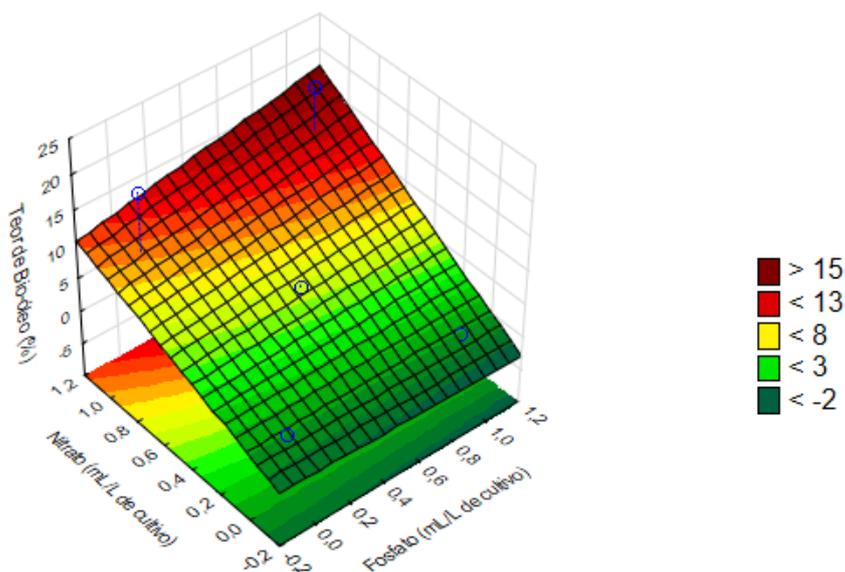
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39 - Superfície de resposta: Estruvita x Fosfato para Teor de Bio-óleo.
DV: Teor de Bio-óleo (%)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 40 - Superfície de resposta: Fosfato x Nitrato para Teor de Bio-óleo.
DV: Teor de Bio-óleo (%)



Fonte: Elaborado pelo autor.

A relação entre os fatores estruvita e fosfato (Figura 39) geraram valores de máximo para as variáveis respostas, quando se tem alta concentração de fosfato (valores próximos aos indicados pela literatura) associado a baixa concentração de estruvita e vice-versa. Uma vez que, a concentração de estruvita utilizada foi definida através da estequiometria de fósforo, o resultado obtido mostra que altas concentrações de estruvita somada a altas concentração de fosfato geram um excesso de fósforo, o que é prejudicial ao cultivo de microalgas. Deste modo, deve-se optar pelo fosfato ou estruvita como fonte de fósforo, para que o cultivo possua resultados satisfatórios.

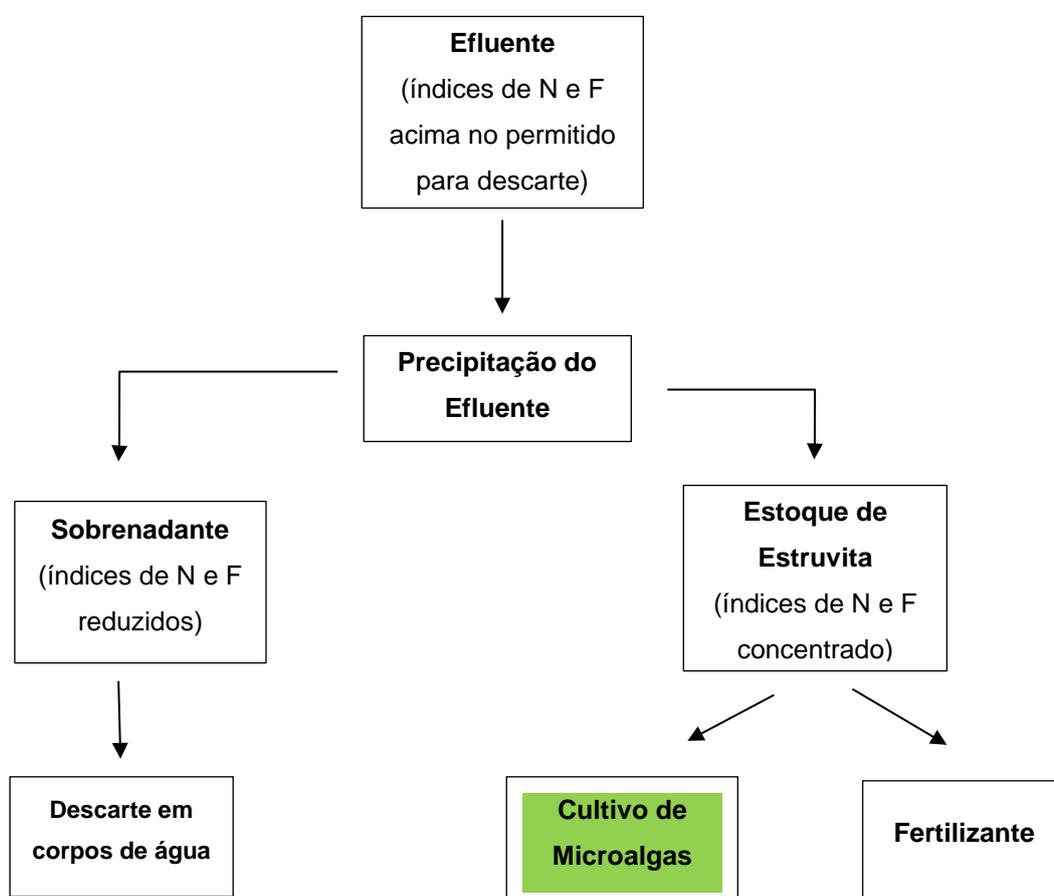
A relação entre os fatores estruvita e nitrato (Figura 38) geraram valores de máximo para as variáveis respostas em altas concentrações de nitrato e estruvita, dentro do intervalo estudado. Um comportamento bem similar a este, foi obtido pela superfície de resposta de fosfato e nitrato (Figura 40).

A análise das superfícies de resposta mostra que a estruvita tem um potencial de substituir o nutriente fosfato como fonte de fósforo em cultivo de microalgas, gerando valores de densidade celular máxima e teores de bio-óleo muito próximos ao do nutriente convencional indicado pela literatura. Este resultado é um indicativo de que efluentes (ricos em nitrogênio e fósforo) tem um potencial para serem utilizados como nutrientes em cultivos de microalgas.

5.8.3.Redução de gastos com nutrientes no cultivo microalgal

Este trabalho traz uma nova abordagem para o cultivo de microalgas, utilizando-se estruvita como nutriente. Deste modo, pode-se acoplar um cultivo microalgal ao processo de precipitação de efluentes industriais ou domésticos, consumindo assim parte do resíduo gerado, gerando benefícios ambientais aliados a redução de custos com cultivo. Esta abordagem pode ser visualizada conforme fluxograma da Figura 41.

Figura 41 - Fluxograma de utilização de estruvita.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9. Separação da biomassa e extração do bio-óleo via Soxhlet

O cultivo na condição de luminosidade 12_h luz: 12_h escuro e utilizando-se estruvita como nutriente em substituição as fontes de fosfato foi conduzido em 21 dias, levando a uma produção de biomassa de 141,112 g em 54 L de cultivo, gerando assim uma taxa de $0,124 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Essa produção de biomassa foi superior à de Millan-Oropeza & Fernandez-Linares (2017), no qual cultivaram a espécie *Nannochloropsis oculata* em lagoas abertas durante o inverno e primavera alcançando uma concentração de biomassa de $0,05 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Isso mostra que o controle de parâmetros como luminosidade, nutrientes, entre outras são fundamentais no crescimento algal.

A Figura 42 mostra a biomassa obtida e a extração via Soxhlet. Nota-se a coloração característica da biomassa (verde) e também do lipídio extraído (amarelada).

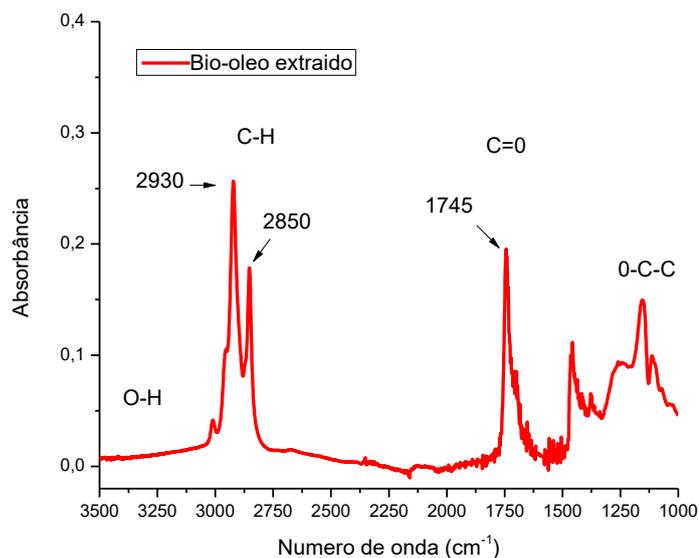
Figura 42 - Biomassa filtrada a vácuo à esquerda. Extração Soxhlet à direita.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro ATR-FTIR do bio-óleo obtido, após todos os processos de extração, pode ser visualizado pela Figura 43.

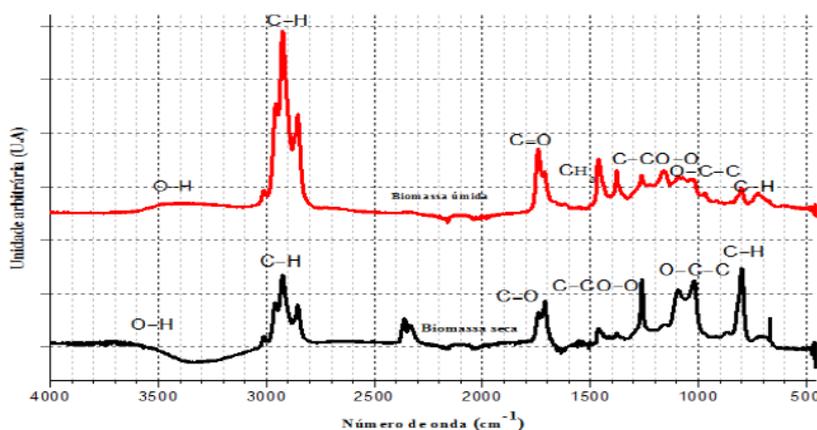
Figura 43 - Espectro ATR-FTIR da amostra de bio-óleo obtido. Cultivo utilizando-se estruvita.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Percebe-se que as bandas de absorção estão situadas nos números de onda característicos dos grupos funcionais de óleos. Pode-se ainda comparar este espectro, com o espectro de bio-óleo obtido através do cultivo de *Nannochloropsis oculata*, proveniente de nutrientes convencionais (meio de cultivo padrão), nas mesmas condições de extração (Figura 44).

Figura 44 - Espectro FTIR das amostras do bio-óleo via base úmida (vermelho) e seca (preto) extraído via Soxhlet com hexano. Cultivo utilizando-se fosfato.



Fonte: (LIMA, 2018)

Nota-se uma grande semelhança entre os espectros via base úmida do cultivo proveniente de nutrientes convencionais, com o proveniente de estruvita. Deste modo,

pode-se dizer que o uso de estruvita como nutriente em cultivo microalgal não interfere nas características de infravermelho do bio-óleo gerado. As diferenças nas intensidades dos picos de absorção podem ter sido geradas por outros fatores, como, por exemplo, eficiência da extração.

A Tabela 18 apresenta o teor de bio-óleo obtido pela extração no método gravimétrico, através do rendimento experimental, em comparação com o teor de bio-óleo obtido pelo método de espectroscopia de FTIR.

Tabela 18 - Teor de bio-óleo. Comparação entre extração e FTIR.

Método	Teor de Bio-óleo (%)	
	Média	Desvio
Extração	11,934	2,305
FTIR	16,433	2,262

Fonte: Elaborado pelo autor.

Borges (2011) observou, no cultivo de microalgas *Nannochloropsis oculata*, com meio de cultivo Guillard f/2, um rendimento de 16,20%, muito próximo ao valor encontrado pelo método de espectroscopia de FTIR.

O menor valor de teor de bio-óleo obtido pela extração, pode ser explicado, devido à grande dificuldade no rompimento da parede celular destes organismos, dentre demais fatores, que dificultam o processo de recuperação de lipídios, provocando perdas no método gravimétrico. Em virtude disso, a técnica de FTIR mostrou-se muito versátil, sendo mais prática, consumindo menor quantidade de amostra e gerando maior rapidez na obtenção de resultados mais precisos (PEPINO, 2013).

6. CONCLUSÃO

As microalgas são sugeridas como fontes promissoras para a produção de biocombustíveis, por serem capazes de conter grandes quantidades de lipídios. Por meio das pesquisas bibliométricas, foi constatado que dentro da plataforma *Web of Science*, os temas “Modelagem de crescimento de microalgas” e “Utilização de estruvita como nutriente de cultivo de microalgas” se mostraram relevantes, devido ao notável aumento das quantidades de publicações e citações ao longo dos últimos anos.

As técnicas de UV-vis e FTIR se mostraram muito versáteis, consumindo menor quantidade de amostra e gerando maior rapidez na obtenção de resultados mais precisos.

Os modelos matemáticos estudados se mostraram adequados para prever a produção da biomassa para as condições de luminosidade 01 e 03. Os menores desvios em relação aos dados experimentais foram obtidos pelo modelo de Stephanopoulos.

A análise da modelagem matemática e de dados experimentais mostraram que a condição de luminosidade 12_h luz: 12_h escuro, dentre as estudadas para cultivo de microalgas *Nannochloropsis oculata*, como a condição que otimiza os valores de densidade celular e teor de bio-óleo, gerando-se ainda uma redução de 0,56 KWh para cada litro de cultivo.

O planejamento experimental mostrou que o nitrato é o nutriente que apresenta maior efeito positivo nas variáveis respostas DMC e teor de bio-óleo. Foram gerados os modelos matemáticos estatísticos, obtendo-se um R^2 de 0,991 para DMC e 0,993 para teor de bio-óleo.

A estruvita apresentou um potencial de utilização como fonte de fósforo em cultivo de microalgas, em substituição ao nutriente fosfato, podendo gerar uma redução de gastos com nutrientes convencionais. O bio-óleo obtido do cultivo de estruvita como nutriente possui características similares ao obtido por nutrientes convencionais.

7. SUGESTÕES FUTURAS

Como sugestões para trabalhos futuros visando dar continuidade aos avanços obtidos nessa pesquisa tem-se:

- Estudar o impacto da variação da intensidade luminosa e outras condições de luminosidade não abordadas neste estudo, no cultivo de microalgas;
- Utilizar os parâmetros e modelos indicados neste trabalho para simular curvas de crescimento microalgal em diversas outras condições de luminosidade;
- Estudar a utilização de estruvita também como fonte de nitrogênio para microalgas, atuando concomitantemente em substituição às fontes de nitrato e fosfato.
- Investigar mais a fundo os desafios econômicos do uso de estruvita para redução de custos com cultivo de microalgas, aplicando cálculos mais detalhados.

8. REFERÊNCIAS

A LOOK BACK AT THE U.S. Usa: **National Renewable Energy Laboratory**, 1998.

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

ALMEIDA, Joseane M; SILVA, Júlio CJ. Espectrofotometria UV-Vis. 2018. 54 slides. Disponível em: < <http://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula-2-UV-Vis-1o-Sem-2018-parte-1.pdf> >. Acesso em: 17 ago. 2018.

ANDRADE, D., S.; FILHO, A., C. Potencialidades e desafios do cultivo. – Londrina: **IPAR**, v1 p.75-264, 2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. 2014.

ARRIADA, A. A. Cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em água de produção de petróleo: viabilidade de crescimento, produção de lipídio e açúcares. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) – **Universidade Federal do Rio Grande**. Rio Grande. 2014.

ASTM, C. 204 84. Standard test method for fineness of Portland cement by air permeability apparatus. Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, USA: ASTM, v. 4, p. 156-62, 1984.

AZEREDO, V. B. S. de. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa preliminar de custos e perspectivas para o brasil. 2012. Rio de Janeiro. 188 p. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**.

BALOYI, H. Algae Liquefaction, **North-West University**, Potchefstroom Campus, p. 180, 2012.

BARATA, R. B. A ABRASCO e a pós-graduação stricto sensu em Saúde Coletiva. In: LIMA, N. T.; SANTANA, J. P.; PAIVA, C. H. A. (Eds.) **RBPG**. Brasília, v. 13, n. 1, 2016.

BARBOSA, L. C. D. A., Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos. 2008. Viçosa. **Universidade Federal de Viçosa**.

BARBOZA, T. R. Análise da eficiência de remoção de amônia, através da precipitação da estruvita, em um reator de leito fluidizado. Dissertação parcial (Mestrado em Energia) – **Universidade Federal do Espírito Santo**. Espírito Santo, p.41. 2019.

BERNARD, Olivier. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. **Journal Of Process Control**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.1378-1389, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprocont.2011.07.012>.

BORGES, L.V.; MORÓN-VILLARREYES, J.A.; D'OCA, M.G.M.; ABREU, P.C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**; v35,p.4449 – 4454, 2011.

BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.313-321, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00083-8).

BORZANI, W. Biotecnologia industrial/[coordenação de] W. Borzani...[et al.]. São Paulo: **Edgard Blucher**, 2001.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant Cell Physiol**. 32, 1077-1082, 1991.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-

products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.557-577, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.

CAI, Ting; PARK, Stephen Y.; LI, Yebo. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 19, p.360-369, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>.

CAMACHO R., F.; GARCIA, C. F.; FERNÁNDEZ, S. J. M., CHISTI, Y.; GRIMA, M. E. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n4, p.459-473.

ÇELEKLI, Abuzer; YAVUZATMACA, Mehmet; BOZKURT, Hüseyin. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 14, p.3625-3629, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.055>.

CHANG, Hai-xing et al. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 206, p.231-238, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.087>.

CHAUMONT, Daniel. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.593-604, dez. 1993. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02184638>.

CHEN, Chun-yen et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.71-81, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

CHIU, Sheng-yi et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.833-838, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.061>.

CHRISTOFFERSEN, K.; KAAS, H. **Toxic cyanobacteria in water**. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. [s.l: s.n.]. v. 45. CONAMA. CONAMA 357 Classificação corpos d'água. CONAMA, 2011.

CHUNG, Jane; LEE, Ilgyu; HAN, Jong-in. Biodiesel production from oleaginous yeasts using livestock wastewater as nutrient source after phosphate struvite recovery. **Fuel**, [s.l.], v. 186, p.305-310, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.084>.

CONCAS, Alessandro et al. Comprehensive modeling and investigation of the effect of iron on the growth rate and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* cultured in batch photobioreactors. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 153, p.340-350, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.085>.

CONVERTI, Attilio et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1146-1151, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>.

COOKSEY, K.E., GUCKERT, J.B., WILLIAMS, S.A., CALLIS, P.R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. **J. Microbiol. Methods** 6, 333–345.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361. Rome, FAO. 1996. 295p.]

DAVIS, Ryan W. et al. Growth of mono- and mixed cultures of *Nannochloropsis salina* and *Phaeodactylum tricornutum* on struvite as a nutrient source. **Bioresource**

Technology, [s.l.], v. 198, p.577-585, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.070>.

DEAN, Andrew P. et al. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 12, p.4499-4507, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; DE CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DISMUKES GC, CARRIERI D, BENNETTE N, ANANYEV GM & POSEWITZ MC (2008) DOAN THI THAI YEN; BALASUBRAMANIAN SIVALOGANATHAN; JEFFREY PHILIP OBBARD. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy** 35 2534-2544, 2011.

D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K. M.; MORONVILLARREYES, J. A.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C. Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass Bioenergy**, p.1533-1538. 2011.

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.

ELSEY, D., JAMESON, D., RALEIGH, B., COONEY, M.J., 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. **J. Microbiol. Methods** 68, 639–642.

EMDADI, D.; BERLAND, B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, v. 26, p. 215-225, 1989.

FARGASOVÁ, A. Inhibitive effect of organotin compounds on the chlorophyll content of the green fresh water alga *Scenedesmus quadriculata*. **Environmental Contamination Toxicology**, 57, p. 99-106. 1996.

FERNÁNDEZ, F. Gabriel Acién et al. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal?. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.577-586, 26 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4362-z>.

FOLEY, P. M.; BEACH, E. S.; ZIMMERMAN, J. B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. **Green Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1399-1405, 2011.

FORTIER, M.O.P.; STURM, B.S.M. Geographic analysis of the feasibility of collocating algal biomass production with wastewater treatment plants. **Environment Science & Technology**. 2012. v.46, p.11426-11434.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. Biodiesel de microalgas: Avanços e desafios. **Química Nova**, Vol. 36, No. 3, p. 437-448, 2013.

GALVÃO, R. M. Modelagem da produção de biomassa da *Haematococcus pluvialis*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – **Universidade Federal da Bahia**. Salvador, 2011.

GE, Shijian; CHAMPAGNE, Pascale. Cultivation of the Marine Macroalgae *Chaetomorpha linum* in Municipal Wastewater for Nutrient Recovery and Biomass Production. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 51, n. 6, p.3558-3566, 6 mar. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b06039>.

GEIS, S.W.; FLEMING, K.L.; KORTHALS, E.T.; SEARLE, G.; REYNOLDS, L.; KARNER, D.A. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19, p. 36-41. 2000.

GERHARDT, R.; REISDORFER, G.; CARDOSO, M. G. Remoção de nitrogênio e fósforo de efluente industrial através da precipitação de estruvita. **Tecno-Lógica**, v. 22, n. 1, p. 35, 22 jan. 2018b.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E.H.; FERNÁNDEZ, F.G. A.; MEDINA, A. R.;CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, **Biotechnology Advances**, 2002.

GRIMA, E. M; MEDINA, A.R.; GIMENEZ, A.G.; PEREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.;SANHEZ, J. L. G. Comparasion between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **J Am Oil Chem Soc**, p. 955 e 9, 1994.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of Marine Invertebrates Animals**. Plenum Publishing, New York, p. 29-60, 1975.

GURSES, A., ACIKYILDIZ, M., GUNES, K., GURSES, M. S., *Dyes and Pigments (SpringerBriefs in Molecular Science)*, 1st edition, **Springer International Publishing, Berlin** (2016).

GUTIÉRREZ, R.; PASSOS, F.; FERRER, I.; UGGETTI, E.; GARCÍA, J. Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production. **Algal Research**, 2015.

HAKALIN S. Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de ciências biológicas. **Universidade Federal de Brasília**, 2014.

HAN, Feifei et al. Enhancement of microalgal biomass and lipid productivities by a model of photoautotrophic culture with heterotrophic cells as seed. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 118, p.431-437, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.066>.

HARUN, Razif et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.1037-1047, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>.

HE, Lian; SUBRAMANIAN, Venkat R.; TANG, Yinjie J.. Experimental analysis and model-based optimization of microalgae growth in photo-bioreactors using flue gas. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 41, p.131-138, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.025>.

HERSH, C.M.; CRUMPTON, W.G. Determination of growth rate depression of some of green algae by atrazine. **Environmental Contamination Toxicology**, 39, p. 1041-1048. 1987.

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. and DARZINS, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant J.** 54, pp. 621-639.

HUANG, G.H., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X.W., CHEN, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Appl. Energ.** 87, 38–46.

HUESEMANN, M. H. et al. A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 110, n. 6, p.1583-1594, 17 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24814>.

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.

JABBOUR, Elias. Conceito Científico” e os Desafios do Desenvolvimento na China de Hoje. In: Conferência Nacional de Política Externa e Política Internacional. **O Brasil no Mundo que Vem Aí**. 2008. p. 161-184.

JI, Min-kyu et al. Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*. **Journal Of**

Environmental Engineering, [s.l.], v. 139, n. 9, p.1198-1205, set. 2013. American Society of Civil Engineers (ASCE). [http://dx.doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0000726](http://dx.doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0000726).

Jl, Min-kyu et al. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 6, p.2701-2710, 9 maio 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4097-x>.

JIANG, Yiqi et al. Cultivation of lipid-producing microalgae in struvite-precipitated liquid digestate for biodiesel production. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-9, 7 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-018-1102-3>.

JIANG, Yiqi et al. The optimization of microalgal culturing in liquid digestate after struvite precipitation using gray relational analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 25, n. 13, p.13048-13055, 26 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1451-2>.

KRANK, J., MURPHY, R.C., BARKLEY, R.M., DUCHOSLAV, E., MCANOY, A., 2007. Qualitative analysis and quantitative assessment of changes in neutral glycerol lipid molecular species within cells. **Methods Enzymol.** 432, 1–20.

LACERDA, Rogério Tadeu de Oliveira; ENSSLIN, Leonardo; ENSSLIN, Sandra Rolim. Uma análise bibliométrica da literatura sobre estratégia e avaliação de desempenho. **Gestão & Produção**, v. 19, n. 1, 2012.

LIANG, Y.N., SARKANY, N., CUI, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnol. Lett.** 31, 1043–1049.

LIMA, Kárita Fernanda Fontes et al. Métodos de extração de bio-óleo a partir da microalga *Nannochloropsis oculata*: uma análise bibliométrica. **Research, Society and Development**, Cidade, v. 7, n. 6, p.1-22, fev. 2018.

LIMA, Kárita Fernanda Fontes. Extração de bio-óleo via base úmida a partir da microalga da espécie *Nannochloropsis oculata*. Dissertação (Mestrado em Energia) – **Universidade Federal do Espírito Santo**. Espírito Santo, f. 97. 2018.

LIN, R., RITZ, G.P. 1993. Studying individual macerals using i.r. microspectroscopy, and implications on oil versus gas/condensate proneness and low rank generation. **Org. Geochem.** 20, pp. 695-706.

LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sérgio Luis Costa; CRUZ, Rosenira Serpa da. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 6, p.1596-1608, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000600044>.

LOURENÇO, S. de O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. **Brasil: RiMa**, 2006.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P. L.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, p. 17-32, 2004.

MA, Xiao-nian et al. Lipid Production from *Nannochloropsis*. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.61-79, 25 mar. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md14040061>.

MAIER, Raina M. **Environmental Microbiology**. 2. ed. University Of Arizona, Tucson, Arizona: Academic Press, 2009. 624 p.

MAL, Y.; WANG, Z.; YU, C.; YIN, Y.; ZHOU, G. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. 2014. **Bioresource Technology** 167 (2014) 503–509.

MANTZOROU, Antonia; VERVERIDIS, Filippos. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 651, p.3187-3201, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355>.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.217-232, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.

MCGINN, Patrick J. et al. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. **Photosynthesis Research**, [s.l.], v. 109, n. 1-3, p.231-247, 9 mar. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-011-9638-0>.

MCGINNIS; DEMPSTER; SOMMERFELD. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. **Journal Of Applied Phycology**, USA, v. 1, n. 9, p.19-24, 1997.

MENG X, YANG X, XU X, ZHANG L, NIE Q & XIAN M Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**. 34: 1-5. 2009.

MILLÁN-OROPEZA, A.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. Biomass and lipid production from *Nannochloropsis oculata* growth in raceway ponds operated in sequential batch mode under greenhouse conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 33, p. 25618-25626, 2017.

MOAZAMI NASRIN; ALIREZA ASHORI; REZA RANJBAR; MEHRNOUSH TANGESTANI; ROGHIEH EGHTESEADI; ALI SHEYKHI NEJAD. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. **Biomass and Bioenergy** 39 449-4 53, 2012.

MOED, Niels M.; LEE, Duu-jong; CHANG, Jo-shu. Struvite as alternative nutrient source for cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 56, p.73-76, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2015.04.027>.

NASCIMENTO, R. Análise da alteração de parâmetros promotores de crescimento em um sistema de cultivo fechado e não contínuo da espécie *Nannochloropsis oculata*. Dissertação (Mestrado em Energia) – **Universidade Federal do Espírito Santo**. Espírito Santo, p.101. 2018.

NAUMANN, D. 2000. Infrared spectroscopy in microbiology. Em: Meyers, R. A. Ed, **Encyclopedia of analytical chemistry**. Chichester: J. Wiley. pp 102-131.

OSUNDEKO, Olumayowa; DAVIES, Helena; PITTMAN, Jon K.. Oxidative stress-tolerant microalgae strains are highly efficient for biofuel feedstock production on wastewater. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 56, p.284-294, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.027>.

PACKER, Aaron et al. Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.111-117, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.029>.

PEPINO, R. F. Desenvolvimento de procedimentos metodológicos na prospecção de microalgas propícias para a produção de biodiesel. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – **Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos. 2013.

PEREZ-GARCIA, Octavio et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.11-36, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>.

QUINN, Jason; WINTER, Lenneke de; BRADLEY, Thomas. Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 8, p.5083-5092, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.019>.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, [s.l.], v. 103, p.444-467, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>.

RAZZAK, Shaikh A. et al. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 27, p.622-653, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>.

RAZZAK, Shaikh Abdur et al. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 76, p.379-390, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>.

REIREZ, M. J. F.; CAMACHO, A. P.; FERREIRO, M. J. BLANCO, J.; PLANAS, M.; CAMPOS, M. J.; LABARTA, U. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.

RIBEIRO, D. M.; S. JUNIOR, P. L. D.; TELES, V. C.; SOARES, I. P.; GARCIA, L. C.; ABREU, P. C. V.; BRASIL, B. dos S. A. F. Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanque aberto tipo raceway. **Embrapa Agroenergia**. 2016.

RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. **Journal Applied Phycology**, v. 12, n. 3–5, p. 441–451, 2000.

RINKEVICH, Baruch. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. **Progress In Industrial Microbiology**, [s.l.], p.133-153, 1999. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6352\(99\)80107-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6352(99)80107-6).

ROCHA, Fellipy S. et al. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy-UV-Vis. **The Canadian Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 96, n. 12, p.2512-2517, 13 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.23344>.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, C.G.; BASSI, N. et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. **Biotechnol. Bioeng**, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.

RUBIO, F. Camacho et al. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 81, n. 4, p.459-473, 18 dez. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10492>.

RUIZ, J. et al. Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater. **Environmental Technology**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.979-991, abr. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2012.724451>.

SATO, N., HAGIO, M., WADA, H. and TSUZUKI, M. 2000. **Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranas**. Em: Harwood, J.L.e Quinn, O.J. Recent Advances in the Biochemistry of Plant Lipids. Portland Press, pp. 912-914.

SCHENK, Peer M. et al. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.20-43, mar. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>.

SILVERSTEIN, R. N.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T. C.1994. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5. **Ed. São Paulo**: Guanabara.

SING, Sophie Fon et al. Production of biofuels from microalgae. Mitigation And Adaptation Strategies For Global Change, [s.l.], v. 18, n. 1, p.47-72, 26 abr. 2011. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1007/s11027-011-9294-x>.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 107f. Dissertação de Mestrado, **Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brasil**, 2010.

STEVENSON, F. J. 1994. **Humus Chemistry: gênese, composition, reactions**. 2. Ed. New York: John Wiley.

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

SUELA, Sólton Colodetti et al. Tratamento de águas residuais para produção de estruvita: um estudo bibliométrico. **Research, Society and Development**, Cidade, v. 7, n. 9, p.1-26, jun. 2018.

SUKARNI; SUDJITO; NURKHOLIS HAMIDI; UUN YANUHAR; I. N. G. WARDANA. Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. **Energy Environ**, 2014.

TANG, Dahai et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3071-3076, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>.

VANINI, L., et al. 1996. Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for data capture in predictive microbiology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 12.

WANG, Bei et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 79, n. 5, p.707-718, 16 maio 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>.

XIN, Li et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 14, p.5494-5500, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.

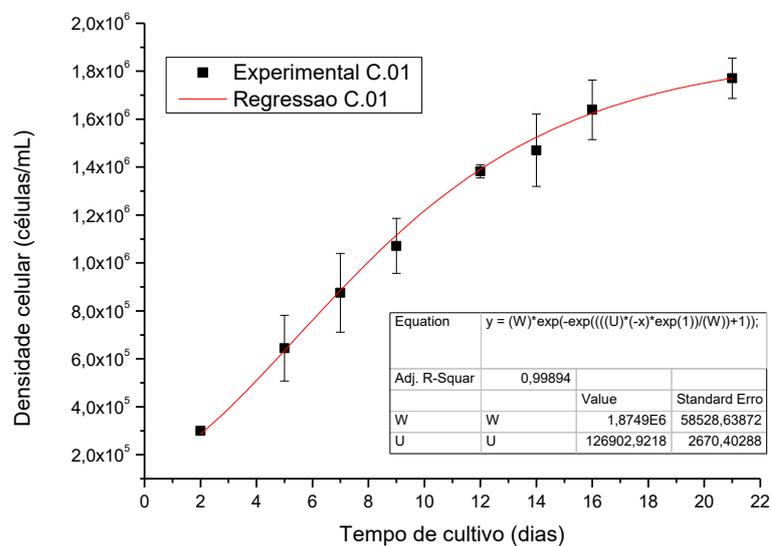
YANG, Jinshui et al. Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 3, p.3077-3082, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.049>.

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.

ZITTELLI, G.C.; RODOLFI, L.; TREDECI, M.R. Industrial production of microalgal cellmass and secondary products-species of high potential. Mass cultivation of *Nannochloropsis* in closed systems. In RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: **Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing. P.298-303, 2004.

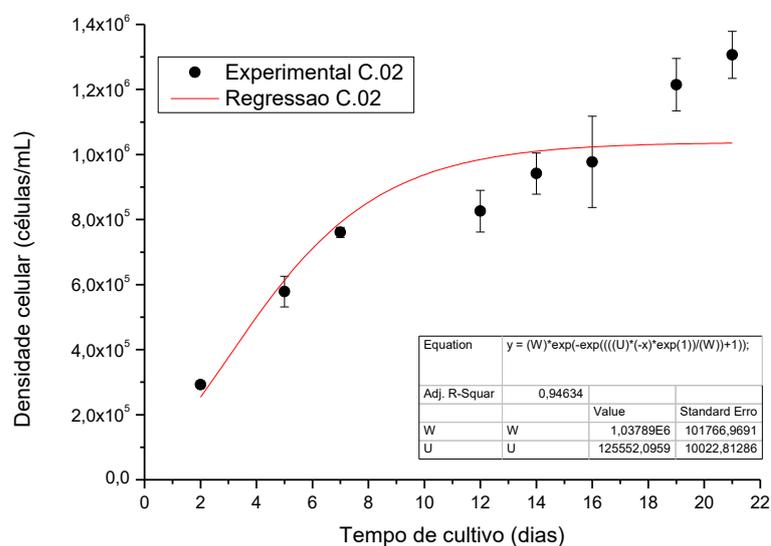
APÊNDICE

Figura 45 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Gompertz, Condição 01.



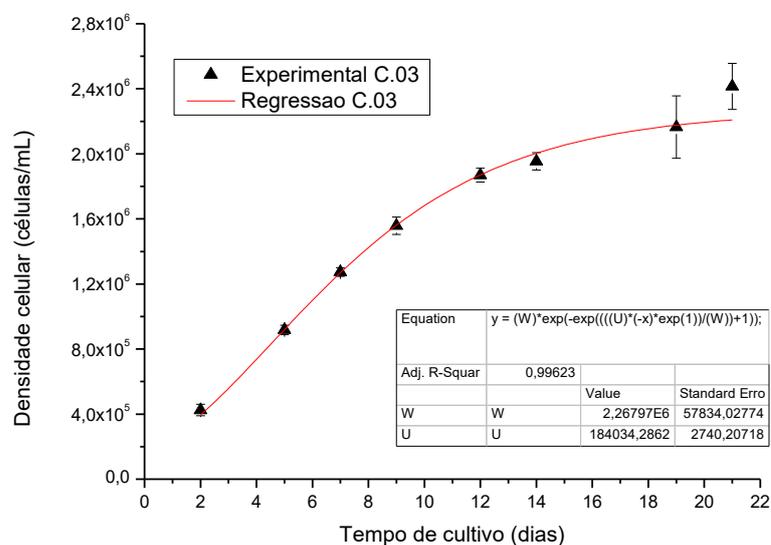
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 46 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Gompertz, Condição 02.



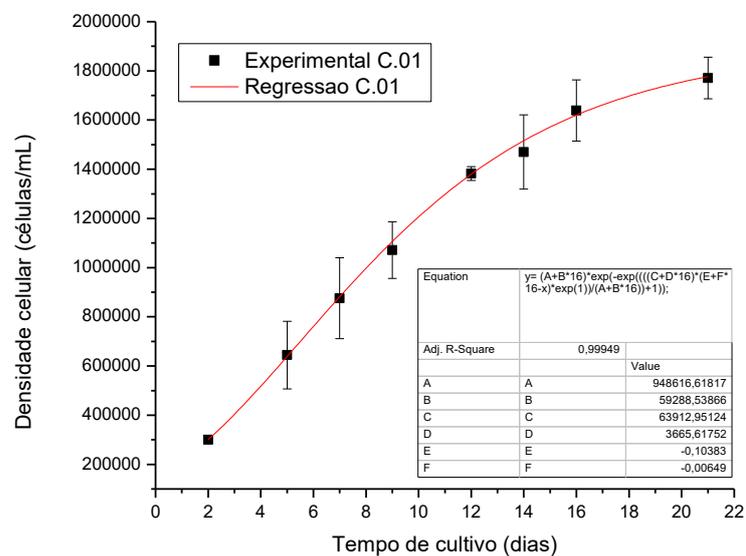
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 47 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Gompertz, Condição 03.



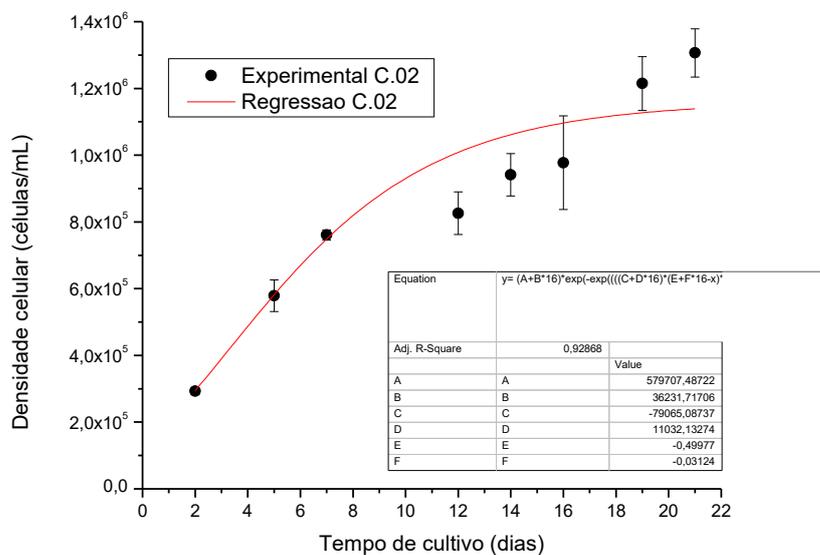
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 48 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Çelekli, Condição 01.



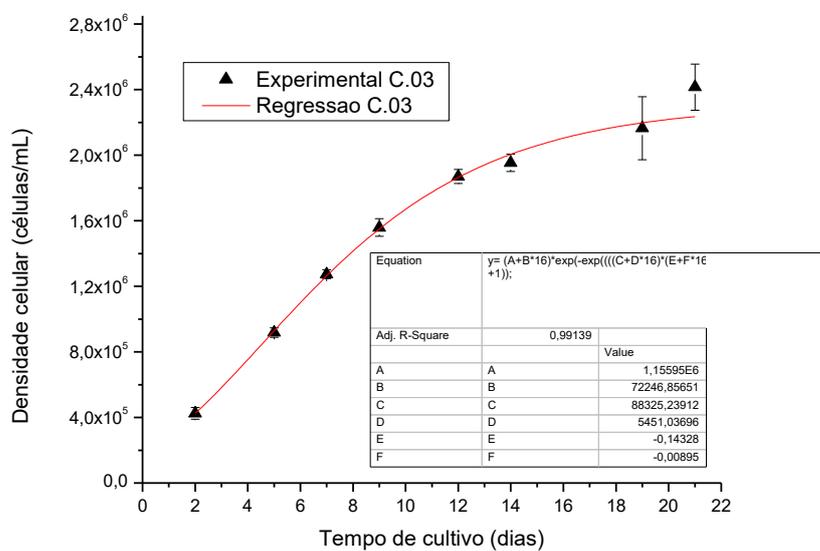
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 49 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Çelekli, Condição 02.



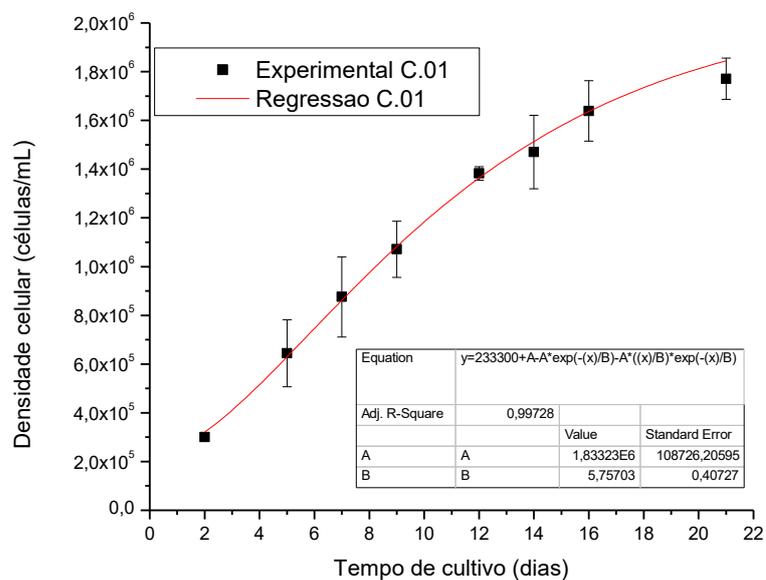
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 50 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Çelekli, Condição 03.



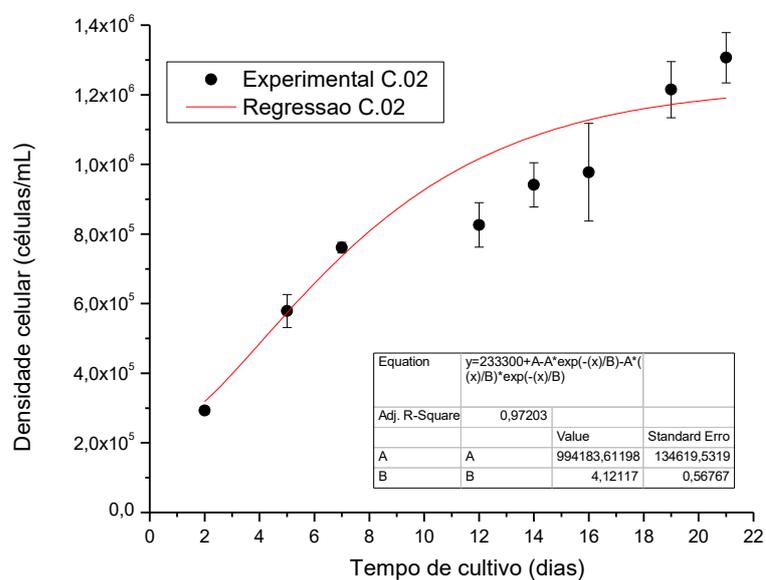
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 51 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Stephanopoulos, Condição 01.



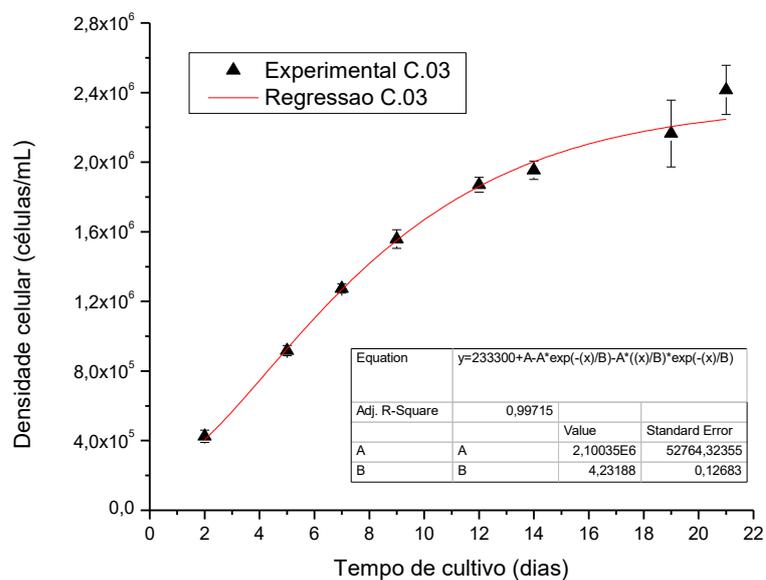
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 52 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Stephanopoulos, Condição 02.



Fonte: Elaborado pelo autor.

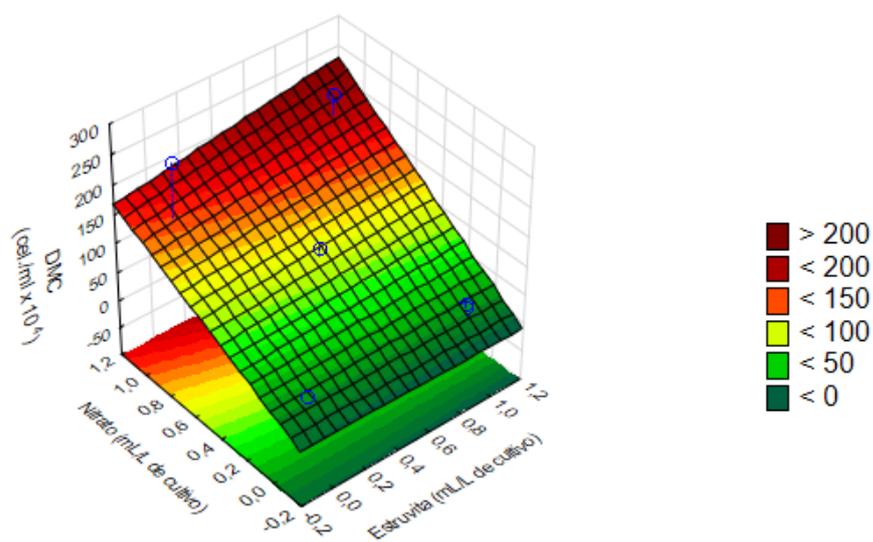
Figura 53 - Ajuste para obtenção de parâmetros do modelo de Stephanopoulos, Condição 03.



Fonte: Elaborado pelo autor.

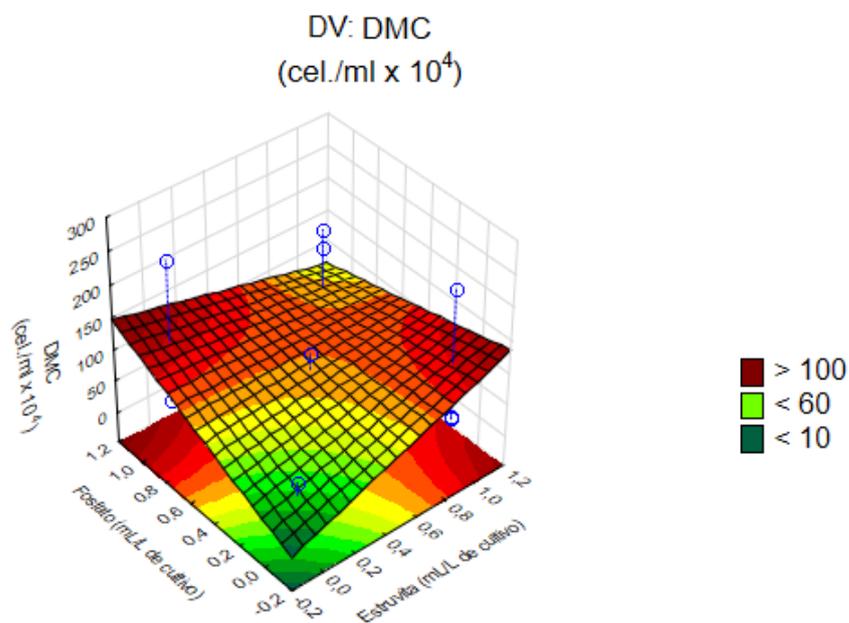
Figura 54 - Superfície de resposta: Estruvita x Nitrato para DMC.

DV: DMC
(cel./ml x 10⁴)



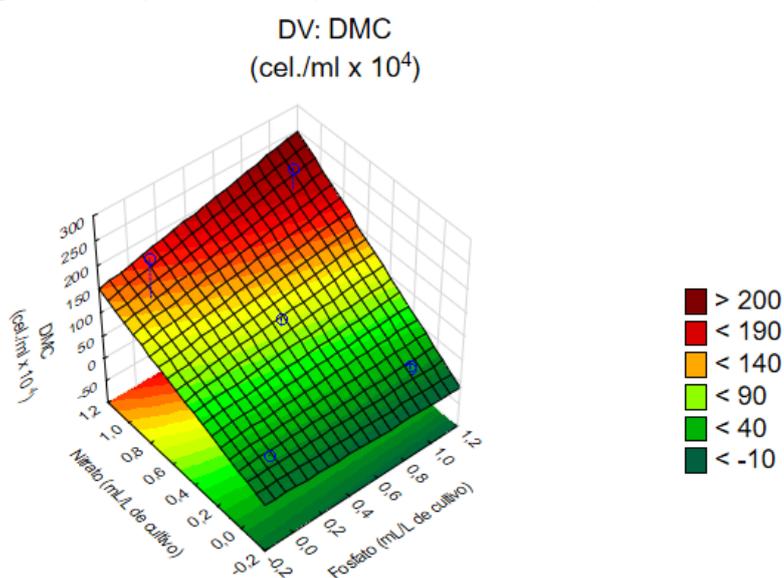
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 55 - Superfície de resposta: Estruvita x Fosfato para DMC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 56 - Superfície de resposta: Fosfato x Nitrato para DMC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 19 - Cálculo do rendimento do bio-óleo obtido pela extração.

	Balão + bio- óleo (g)	Balão (g)	Bio-óleo (g)	Biomassa (g)	Rendime nto (%)
Extração 1	97,388	95,509	1,880	19,086	9,848
Extração 2	158,607	156,133	2,474	19,174	12,903

Fonte: Elaborado pelo autor.